

Prüfung der Unschädlichkeit und Wirksamkeit
einer numerisch-additiven
Kombinationsimpfung gegen Tetanus
und Gasbrand bei Ferkeln und Affen

Luise Andrae

1902



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549008_0004

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr

Prüfung der Unschädlichkeit und Wirksamkeit einer numerisch-
additiven Kombinationsimpfung gegen Tetanus und Gasbrand bei
Ferkeln und Affen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Luise Andrae
aus
Mühldorf/Obb.

München 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 30. Juli 1982



DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. <u>Einleitung</u>	1
2. Schrifttum: <u>Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle Infektionskrankheiten der Tiere</u>	2
2.1. <u>Definitionen</u>	2
2.2. <u>Vor- und Nachteile von Kombinationsimpfstoffen</u>	3
2.3. <u>Polyvalente Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle Krankheiten</u>	6
2.3.1. <u>Eigenschaften</u>	6
2.3.2. Polyvalente Kombinationsimpfstoffe gegen E.coli	6
2.3.3. Polyvalente Kombinationsimpfstoffe gegen Salmonellen	10
2.3.4. Sonstige polyvalente Kombinationsimpfstoffe	12
2.4. <u>Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe</u>	14
2.4.1. <u>Eigenschaften</u>	14
2.4.2. Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle Infektionen	14
2.4.3. Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle und virale Infektionen	17
2.5. <u>Funktionell-synergistische Kombinationsimpfstoffe</u>	18
2.5.1. <u>Eigenschaften</u>	18
2.5.2. Funktionell-synergistische Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle Infektionen	19
2.5.3. Funktionell-synergistische Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle und virale Infektionen	20
3. <u>Eigene Untersuchungen</u>	24
3.1. <u>Material und Methoden</u>	24

3.1.1.	Versuchstiere	24
3.1.2.	Impfstoffe	24
3.1.3.	Blutentnahme	25
3.1.4.	Antitoxinnachweis	25
3.1.4.1.	ELISA	25
3.1.4.2.	Neutralisationstest	26
3.2.	<u>Ergebnisse</u>	27
3.2.1.	Untersuchungen bei Ferkeln	27
3.2.2.	Untersuchungen bei Affen	39
4.	<u>Besprechung der Ergebnisse</u>	42
5.	<u>Zusammenfassung</u>	46
	<u>Summary</u>	47
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	48

Lebenslauf

1. Einleitung

Unter den zahlreichen, bis zur Praxisreife entwickelten und im Handel erhältlichen Clostridien-Vaccinen fehlt bisher eine numerisch-additive Kombinationsvaccine gegen die klassischen Gasbranderreger *C.perfringens* Typ A, *C.novyi* Typ A und gegen den Tetanuserreger *C.tetani*. Eine Kombinationsvaccine gegen die Toxine dieser drei Erreger wäre besonders wichtig, weil alle drei in Krisenzeiten (Naturkatastrophen, Krieg, etc.) gleichzeitig zur Bedrohung werden können. Ein schneller Impfschutz läßt sich dann aber nur erreichen, wenn schnell, ohne notwendige lange Wartezeiten zwischen den einzelnen Einfachimpfungen, mit einem Kombinationsimpfstoff gegen alle drei Toxine gleichzeitig immunisiert werden könnte.

In ersten Untersuchungen bei der Maus wurde bewiesen, daß eine Kombination der drei Toxoide von *C.perfringens* Typ A, *C.novyi* Typ A und *C.tetani* durchaus möglich ist (65). In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Wirksamkeit und Unschädlichkeit der numerisch-additiven Kombinationsvaccine an weiteren Versuchstieren (Schwein, Affe) geprüft. Im Rahmen dieser Untersuchungen sind zusätzlich schnelle und zuverlässige Nachweismethoden für Clostridien-Antitoxine ausgearbeitet worden, die später auch beim Menschen eine Wirksamkeitsbestimmung der Kombinationsvaccine erlauben.

2. Schrifttum

Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle Infektionskrankheiten der Tiere

2.1. Definitionen

Impfstoffe sind Arzneimittel, die Antigene enthalten und dazu bestimmt sind, bei Mensch oder Tier zur Erzeugung von spezifischen Abwehr- oder Schutzstoffen angewendet zu werden (24). Die Impfstoffe lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung und Herstellung in Lebendimpfstoffe, Impfstoffe aus inaktivierten Erregern, Toxoidimpfstoffe und Spalt- oder Subunit-Impfstoffe einteilen. Jede dieser 4 Impfstoffarten kann als Einfachvaccine oder Mehrfachvaccine eingesetzt werden. Mehrfach- oder Kombinationsimpfstoffe enthalten im Gegensatz zu Einfachimpfstoffen Antigene von mindestens zwei Erregern, Toxinen oder Serotypen eines Erregers. Je nach antigenen Zusammensetzung teilen Mayr und Köhler (57) die Mehrfach- oder Kombinationsimpfstoffe in folgende Gruppen ein:

1. polyvalente Kombinationsimpfstoffe,
2. numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe und
3. funktionell-synergistische Kombinationsimpfstoffe.

Die polyvalenten Kombinationsimpfstoffe setzen sich aus den Antigenen unterschiedlicher Serotypen einer Spezies oder aus den Antigenen biologisch und biochemisch einheitlich, aber antigenetisch unterschiedlicher Spezies einer Gattung zusammen. Das Einsatzgebiet der polyvalenten Kombinationsvaccinen erstreckt sich auf spezifische Infektionskrankheiten und jedes in der Vaccine enthaltene Antigen ist spezifisch wirksam. Beispiele sind die E.coli- oder Salmonellen-Impfstoffe.

Als numerisch-additiv werden Kombinationsimpfstoffe bezeichnet, die zwei oder mehr Antigene von biologisch, biochemisch und antigenetisch unterschiedlichen Erregern

enthalten. Die Antigene stammen von Erregern spezifischer Infektionskrankheiten und jedes einzelne Antigen kann auch erfolgreich in einem Einfachimpfstoff eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind die numerisch-additiven Kombinationsimpfstoffe gegen Diphtherie, Tetanus und Poliomyelitis beim Kind, oder die Kombinationsvaccinen gegen Staupe, Leptospirose und Hepatitis contagiosa canis beim Hund.

Die funktionell-synergistischen Kombinationsimpfstoffe enthalten zwei oder mehr Antigene von biologisch, biochemisch und antigenetisch unterschiedlichen Erregern, die an der Entstehung von Faktorenkrankheiten beteiligt sind. Jedes einzelne Antigen ist nur begrenzt wirksam, die volle Wirksamkeit ergibt sich aus dem Synergismus der in der funktionell-synergistischen Kombinationsvaccine enthaltenen Antigene (55,56,22). Ein Beispiel für die funktionell-synergistischen Kombinationsvaccinen sind Impfstoffe gegen den Rindergrippekomplex.

2.2. Vor- und Nachteile von Kombinationsimpfstoffen

Aus der Tatsache, daß mit einem Kombinationsimpfstoff gleichzeitig gegen mehrere Infektionserreger immunisiert werden kann, resultieren viele Vorteile. Der einmalige Impfstoff bringt z.B. nur einmal das Risiko der Lokalreaktionen oder der Aktivierung von latenten Infektionen (69). Auch die Gefahr der Allergisierung wird bei Anwendung von Kombinationsimpfstoffen vermindert, da der Impfling nur einmal den sensibilisierenden Hilfs- und Begleitstoffen wie Entschäumer, Stabilisatoren etc. ausgesetzt ist, die jede Vaccine enthält (54). Der Streß durch die Mechanik und Unruhe des Impfstoffes und die daraus resultierende Leistungsdepression tritt nur einmal auf.

Es ist möglich, den Kombinationsimpfstoff billiger herzustellen als die entsprechenden Einfachimpfstoffe, da nur einmal die Kosten für die Hilfs- und Begleitstoffe, für Verpackung, Werbung, Transport usw. anfallen. Auch

an den Arztkosten wird gespart, weil für eine Kombinationsimpfung das gleiche Honorar anfällt, wie für eine Einfachimpfung.

Kombinationsvaccinen entlasten den Impfkalender und machen die Impftermine überschaubarer und besser kontrollierbar. Dieser Vorteil wirkt sich vor allem in der Aufzuchtphase günstig aus, in der häufige Grundimmunisierungen nötig sind (42, 62). Durch weniger Wartezeiten wird es durch Kombinationsimpfstoffe möglich, nach dem Ende der passiven Immunität schnell einen Schutz gegen alle wichtigen Aufzuchtkrankheiten aufzubauen. Die Zeit der Empfänglichkeit beim Jungtier für diese Infektionserreger wird dadurch verkürzt. Den polyvalenten und funktionell-synergistischen Kombinationsimpfstoffen werden neben der spezifischen Immunstimulierung auch paramunisierende und kreuzimmunisierende Eigenschaften zugeschrieben (53, 43). Dies sind Eigenschaften, die vor allem für die Bekämpfung von Faktorenkrankheiten eine wichtige Rolle spielen, bei denen ein schneller Schutz erreicht werden muß und bei denen oft Erreger mit großer Antigenvarianz beteiligt sind.

Die Kombination von Antigenen in einer Vaccine kann aber nicht unbegrenzt und beliebig vorgenommen werden. Es gibt Untersuchungen mit Impfstoffen aus Enterobacteriaceen oder verschiedenen Clostridientoxoiden (61, 88), die zeigen, daß die Immunantwort einzelner Antigene bei der Kombinationsvaccine deutlich schwächer war als die der entsprechenden Einfachvaccine. Es können auch nicht beliebig viele Komponenten in einem Impfstoff verwendet werden, da der Gesamtdosis Grenzen gesetzt sind.

Ein weiterer Nachteil der Kombinationsvaccine ist, daß sich die Wirksamkeit aller Antigene nach dem schwächsten Antigen richtet (34). Revaccinationstermine und Haltbarkeitsangaben müssen auf das schwächste Glied abgestimmt werden, wobei sich häufig für einzelne Antigene wesentlich ungünstigere Konditionen ergeben, als im Falle der Einfachimpfstoffe (41).

Die Kombination der Antigene muß sich am Einsatzgebiet orientieren. Es ist nur sinnvoll, Antigene von Erregern zu kombinieren, die sich im räumlichen und zeitlichen Auftreten und tierartlichen Spektrum oder im Krankheitsbild ähneln (34, 3, 64).

Kombinationsvaccinen benötigen eine wesentlich längere Entwicklungszeit als Einfachvaccinen. Die Untersuchungen zur Wirksamkeit müssen zweigleisig verlaufen, nämlich einmal auf die Interaktionen der einzelnen Antigene untereinander und zum anderen auf das isolierte Antigen allein. Die längere und schwierigere Prüfung verteuert letztlich die Entwicklung der Kombinationsvaccinen wieder (64).

2.3. Polyvalente Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle Krankheiten

2.3.1. Eigenschaften

Polyvalente Kombinationsimpfstoffe haben in der Bakteriologie vor allem im Laufe der letzten Jahre an Bedeutung gewonnen, weil einmal mehr Erfahrungen über die Antigenstruktur der Bakterien vorliegen und zum anderen immer häufiger Bakterien mit großer Serotypenvarianz am aktuellen Seuchengeschehen beteiligt sind. Die Anwendung polyvalenter Impfstoffe setzt sorgfältige epidemiologische Untersuchungen über die Verbreitung und geographische Verteilung einzelner Serotypen voraus. Auch während des Impfstoffeinsatzes muß ständig das Seuchengeschehen kontrolliert werden, um eventuell neu auftretende Serotypen oder Serotypwechsel bei der Herstellung der Vaccinen berücksichtigen zu können. Für die Immunisierung können unterschiedliche Antigene herangezogen werden. Es gibt polyvalente Kombinationsvaccinen auf der Basis von "somatischen" Antigenen (z.B. hitzeinaktivierte Bakterien, 5, 6, 66, 67, 70), von Kapselantigenen (z.B. formalininaktivierte Bakterien, 13, 27, 46, 49) oder von Toxoiden (z.B. formalininaktivierte Toxine, 41). Die Wirkung der polyvalenten Kombinationsvaccinen ist primär antigenspezifisch (6, 7). Die Immunität ist aber in der Regel nach Impfung mit der polyvalenten Vaccine besser als nach Impfung mit einem entsprechenden monovalenten Impfstoff (17). Dies ist wahrscheinlich auf gemeinsame schwächere Begleitantigene, bzw. auf den Adjuvanseffekt der Leitantigene zurückzuführen.

2.3.2. Polyvalente Kombinationsimpfstoffe gegen E.coli

Die polyvalenten E.coli-Kombinationsimpfstoffe besitzen derzeit die größte Bedeutung in der Tiermedizin. Sie lassen sich aufgrund ihrer Zusammensetzung in Impfstoffe aus lebenden oder inaktivierten E.coli-Keimen unterteilen.

Die beschriebenen polyvalenten Lebendimpfstoffe setzen sich entweder aus virulenten Feldkeimen oder schwach-virulenten R-Formen oder avirulenten, streptomycinabhängigen Mutanten von E.coli zusammen. Lebendimpfstoffe auf der Basis virulenter Feldkeime eignen sich nur zur oralen Immunisierung der Muttertiere, da bei Jungrindern Impferkrankungen auftreten, sofern nicht durch faserreiche und eiweißarme Mangel-diät das Wachstum der Keime unterbunden wird (9). Aber selbst bei Muttertieren bleibt die Anwendung aus seuchenhygienischen Gründen problematisch, da auf diese Weise virulente Keime unkontrolliert verstreut werden. Mit virulenten Keimen oral geimpfte Muttersauen haben nach Porter (68) auch kleinere Würfe mit mehr lebensschwachen oder schlecht wachsenden Ferkeln.

Besser geeignet sind E.coli-Impfstoffe auf der Basis lebender avirulenter Keime. Erfahrungen liegen bisher mit streptomycinabhängigen (Smd)-Mutanten vor. Ferkel von Muttersauen, die mit einem pentavalenten Lebendimpfstoff aus den Smd-E.coli-Stämmen O 139, O 149, O 8, O 141 und O 64 oral über 10 Tage immunisiert worden waren, überlebten eine intestinale Belastung mit Endotoxin und Enterotoxin besser als Ferkel von Sauen, die mit einer Vaccine aus inaktivierten E.coli-Keimen geimpft worden waren (87). Mit den streptomycinabhängigen Mutanten lassen sich auch Absatzferkel problemlos immunisieren. Eine zehnmalige orale Immunisierung mit 10^{10} Smd-Keimen schützte Ferkel vor einer natürlichen Infektion mit enterotoxischen E.coli-Stämmen. In Feldversuchen ließ sich die Verlustrate durch die orale Impfung von 8 % bei ungeimpften Ferkeln auf 2 % bei den geimpften senken (77).

Mit avirulenten R-Formen enterotoxischer E.coli-Stämme war nach einer Muttertierimpfung bei Rindern keine Wirksamkeit nachzuweisen (77).

Wesentlich mehr Erfahrungen als mit den Lebendimpfstoffen

liegen mit E.coli-Impfstoffen auf der Basis inaktivierter Keime vor. Vor allem polyvalente Vaccinen aus hitzeinaktivierten E.coli-Keimen haben sich als Oralimpfstoffe gegen die E.coli-Diarrhoen bewährt. Ein polyvalenter E.coli-Oralimpfstoff für das Kalb, der einmal täglich an den ersten 10 Lebenstagen über die Milch appliziert wird und der aus den Antigenen der O-Gruppen 8, 9, 15, 35, 55, 78, 86, 101, 117 und 149 besteht, senkte in Problembetrieben die Morbiditäts- und Mortalitätsraten signifikant. Der Schutzeffekt der Vaccine war streng O-antigenspezifisch und erstreckte sich nur auf enterotoxische E.coli-Stämme aus den in der Vaccine enthaltenen O-Gruppen. Beim Auftreten anderer enterotoxischer E.coli-Stämme half nur eine stallspezifische Vaccine (5, 6).

Mit einem auf derselben Basis hergestellten E.coli-Oralimpfstoff für das Ferkel, der Antigene aus den O-Gruppen 8, 138, 139, 141 und 149 enthielt, ließ sich beim neugeborenen und abgesetzten Ferkel ebenfalls eine Immunität gegen E.coli-Infektionen erzeugen (4, 7).

Ähnlich gute Ergebnisse mit polyvalenten E.coli-Impfstoffen auf der Basis hitzeinaktivierter E.coli-Keime erzielten Porter et al. (66,67) bei Ferkeln und Kälbern. Der polyvalente E.coli-Impfstoff für Kälber enthielt die O-Antigene 8, 9, 15, 26, 78, 137 und 139, der Impfstoff für die Ferkel die Antigene O 8, O 139, O 147, O 45, O 141, O 138 und O 149. Die Wirksamkeit der Vaccinen konnte durch den Anstieg spezifischer sekretorischer Antikörper im Darm (IgA), der besseren Gewichtszunahme und der geringeren Behandlungshäufigkeit bei den geimpften Tieren im Vergleich zu den nicht geimpften Tieren nachgewiesen werden (66, 67).

Neben den E.coli-Vaccinen aus hitzeinaktivierten Keimen gibt es auch Untersuchungen mit Impfstoffen aus formalin-inaktivierten Keimen. Eine E.coli-Adsorbatvaccine ($\text{Al}(\text{OH})_3$) aus formalinisierten E.coli-Keimen der Typen O 8:K 87, K 88ab, O 8:K87, K 88ac, O 45:KE 65, K 88ac, O 64:LV 142, O 138:K 81 O 139:K 82, O 142:K 85ac, O 141:K 85ab, K 88ac,

O 147:K 88ac, K 89, O 141:K 91, K 88ac und O 157:KV 17, K 88ac schützte Ferkel von geimpften Muttertieren gegen Durchfälle der ersten Lebenstage. Derselbe Impfstoff wird auch zur Immunisierung von Absatzferkeln gegen E.coli-Infektionen empfohlen (13, 23, 82). Ein in der DDR entwickelter E.coli-Formolimpfstoff zur Muttertiervaccination enthält die E.coli-Keime der Serotypen O 8:K 87, K 88, O 138:K 81, K 88, O 147:K 89, K 88, O 149:K 91, K 88 (Coliporc "Dessau"). Nach zweimaliger subcutaner Immunisierung 5 und 3 Wochen vor dem Wurftermin ließen sich die Ferkelverluste in Problembetrieben um 5 % senken (46, 91). Dziaba et al. (27) bestimmte die Wirksamkeit seiner Formol-vaccine aus O 8:K 87, K 88ab, O 149:k 91, K 88ac, O 141:K 85, O 139:K 82 und O 147:K 89, K 85 E.coli-Keimen mit dem Darmligaturtest. 10 Tage alten Ferkeln wurde über 10 Tage dieser Impfstoff oral appliziert. 14 Tage p. vacc. war bei den immunisierten Tieren die Reaktion im Darmligaturtest ab einer Belastungsdosis von 10^4 Keimen negativ, dagegen bei den Kontrolltieren erst ab einer Belastungsdosis von 10^9 Keimen.

Beim Rind gibt es vergleichsweise wenig Erfahrungen mit polyvalenten E.coli-Formolimpfstoffen. Eine Muttertiervaccine, die 6 verschiedene K-Antigene enthielt, war nur wirksam, wenn die in der Vaccine enthaltenen K-Antigene, auch bei dem Infektionserreger nachgewiesen werden konnten. Die Impfung der Muttertiere mußte dazu zweimal innerhalb von 4 Wochen vor dem Abkalbetermin vorgenommen werden (59, 60).

Illés (36) verglich die Wirksamkeit zweier bivalenter E.coli-Impfstoffe (Stamm EC-O 141:B 85 + EC-O 139:B 82), die entweder aus acetoniaktivierten oder aus formalin- und hitzeinaktivierten Keimen zusammengesetzt waren. Eine dreimalige orale Immunisierung mit dem Acetonimpfstoff schützte das Ferkel nicht vor einer tödlichen Challengedosis, nur die mit dem Impfstoff aus formalin- und hitzeinaktivierten Keimen geimpften Ferkel überlebten die Belastungsinfektion.

Sehr aktuell sind derzeit E.coli-Impfstoffe, die Antigene der Enterotoxine und der Fimbrien oder Pili von E.coli enthalten. Die meisten dieser Impfstoffe werden monovalent angeboten, d.h. sie enthalten nur eines dieser Antigene. Eine Ausnahme bildet der Impfstoff "Nobivac" ^RLT K 88 (Fa. Wellcome). Dieser E.coli-Impfstoff besteht aus 4 000 Einheiten des hitzelablen Enterotoxins, 400 Einheiten des Fimbrienantigens K 88ab und 128 Einheiten des Fimbrienantigens K 88ac. Der Impfstoff ist für die parenterale Immunisierung der Muttersauen und der abgesetzten Ferkel konzipiert. Durch langfristige Immunisierung mit diesem Impfstoff wird in Beständen der Infektionsdruck durch enteropathogene E.coli-Keime soweit vermindert, daß nach einigen Wurfseasonen die Impfung eingestellt werden kann, ohne daß neue E.coli-Infektionen auftreten (85).

2.3.3. Polyvalente Kombinationsimpfstoffe gegen Salmonellen

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen über polyvalente Kombinationsimpfungen gegen die Salmonellose der Tiere. Die meisten Untersuchungen zielten auf eine polyvalente Kombinationsvaccine gegen Typhus und Paratyphus beim Menschen ab.

Aus der Deutschen Demokratischen Republik (DDR) wurde über Ergebnisse mit einem bivalenten Salmonella-Impfstoff (Murivacc ^R "Dessau") berichtet, der aus 2 S.typhimurium-Stämmen besteht, die sich im Lysotyp unterscheiden. Dieser Formolimpfstoff war sowohl zur Impfung von Muttertieren (Zweimal s.c. in der 5. und 2. Woche a.p.) als auch zur Anwendung bei Kälbern (2 bis 3malige Impfung im Abstand von 2-3 Wochen) geeignet. Der Impferfolg ließ sich durch die Senkung der Morbidität und Mortalität im Infektionsbelastungsversuch und im Feldversuch ablesen (90).

Raettig (70) beschreibt eine Vaccine aus hitzeinaktivierten Keimen von 9 verschiedenen S.typhimurium-Stämmen. Der Impfstoff wird in einer Dosierung von 10^9 Keimen pro

Stamm unter Leinsamenschleim gemischt und den Kälbern fünfmal in eintägigem und dreimal in zweitägigem Abstand oral, auf nüchternen Magen verabreicht. Nach der Immunisierung kam es in 27 mit *S.typhimurium* verseuchten Beständen zur schnellen Eliminierung der *Salmonella*-Keime und in 25 Beständen wurden keine Neuausbrüche mehr beobachtet.

Dickel (25) setzte bei Kälbern in Problembetrieben eine bivalente *Salmonella*-Vaccine ein, die auf hitzeinaktivierten *S.typhimurium* und *S.dublin*-Keimen basierte. Zehn Tage nach der zehnmaligen oralen Impfung waren nur mehr 21,8 % der ursprünglich *Salmonellen*-ausscheidenden Kälber positiv. Durch Revaccination konnte die Ausscheiderquote noch weiter gesenkt werden. In den Impfpausen kam es zwar zu keinen Neuausbrüchen, aber viele bereits *salmonellen*freie Kälber schieden später wieder *Salmonellen* aus.

Nicht ganz befriedigend verliefen auch die Untersuchungen mit einer polyvalenten *S.typhimurium*-Vaccine bei Tauben. Die Vaccine bestand aus formalininaktivierten *S.typhimurium*-Keimen von vier verschiedenen Stämmen. Mit dieser Vaccine wurden Tauben intramuskulär oder oral immunisiert. Agglutinationstiter zwischen 1:10 und 1:160 waren nur nach intramuskulärer Impfung nachweisbar. Nach der Testinfektion mit ca. 5×10^6 Keimen starben alle Kontrolltiere, aber nur 3 der intramuskulär geimpften und keines der oral immunisierten Tiere, trotz höherer Belastungsdosis (2×10^{11}). Beide Impfungen verhinderten aber nicht die Ausscheidung der *Salmonella*-Keime über einen längeren Zeitraum (49). Dagegen waren in den Organen von oral mit hitzeinaktivierten Keimen von 2 *S.typhimurium*-Stämmen geimpften Hühnern nach oraler Testinfektion seltener *Salmonellen* nachzuweisen, als bei nicht geimpften Tieren. Dieses positive Ergebnis konnte nur mit der *S.typhimurium*-Vaccine erzielt werden, eine *S.pullorum*-Vaccine war hingegen wirkungslos (11).

2.3.4. Sonstige polyvalente Kombinationsimpfstoffe

Einen polyvalenten Kombinationsimpfstoff gegen Streptococcus pneumoniae entwickelte Hammer (32). Der Impfstoff bestand aus 12 Polysaccharidantigenen von S.pneumoniae. Pro Antigen mußte trockenstehenden, trächtigen Kühen mindestens 0,2 mg, besser 0,4 mg, Antigen sechsmal, im Abstand von einer Woche, intracisternal appliziert werden. Danach waren Kälber der geimpften Kühe deutlich besser gegen eine Testinfektion mit S.pneumoniae geschützt als Kälber nicht geimpfter Muttertiere, bzw. als mit Immunokolostrum behandelte Jungtiere. Die Dauer der passiven Immunität betrug 4 Wochen. Für die Wirksamkeit war es gleichgültig, ob ein Antigen oder zwölf Antigene zugleich appliziert wurden. 12 Monate p.vacc. konnten bei den immunisierten Muttertieren noch 57 % der kurz nach der Impfung festgestellten Antikörpertiter nachgewiesen werden (32).

Weniger erfolgreich waren Impfversuche mit einer polyvalenten Streptokokkenvaccine beim Schwein. Mit der nicht näher beschriebenen polyvalenten Vaccine aus verschiedenen Streptokokkenstämmen impften Schöll et al. (78) Muttersauen zweimal im letzten Trächtigkeitsdrittel. Nach der Immunisierung wurde aber nur der Zeitpunkt des Krankheitsausbruches von dem 1. in den 3. Lebensmonat verschoben. Außerdem traten in "Impfbeständen" nach der Impfung vermehrt Stämme auf, deren Antigene nicht in der Vaccine enthalten waren.

Cameron und Smit (17) impften Schafe mit einem polyvalenten Pasteurella multocida-Impfstoff. Diese Vaccine bestand aus formalininaktivierten Keimen von 9 verschiedenen P.multocida-Stämmen (A7, A3, A5, A11, A8, A9, D, D4, D3). Eine zweimalige subcutane Impfung innerhalb von 4 Wochen stimulierte deutliche Antikörperanstiege. Die Titer zwischen den verschiedenen Antigenen schwankten erheblich, trotz gleicher Antigendosis, was nach Cameron et al. (17, 18)

auf die unterschiedlich immunisierenden Eigenschaften bei den verschiedenen Impfstämmen hinweist. Im Vergleich zu einem Lebendimpfstoff schnitt die Vaccine aus inaktivierten Keimen besser ab. (16, 18).

Polyvalente Pasteurella-Vaccinen aus inaktivierten oder lebenden, avirulenten Keimen wurden bei Truthühnern geprüft. Die inaktivierte Vaccine enthielt formolinaktivierte Keime von 3 verschiedenen *P.multocida*-Stämmen, die orale Revaccination wurde mit dem Lebendimpfstoff durchgeführt. Der lebende, avirulente Stamm stimulierte die Immunitätsbildung besser, als die inaktivierten Keime. Durch die Immunisierung konnte die Infektionsanfälligkeit der Puten bis 30 Wochen p.vacc. verringert werden (10).

Kombinationsimpfstoffe gegen Clostridien-Toxine sind in der Mehrzahl numerisch-additiv. Eine Ausnahme bildet ein polyvalenter *C.perfringens*-Impfstoff, der aus Toxoiden der beiden *C.perfringens* Typen D und C besteht (β - und ϵ -Toxoid). Die postvaccinale Antitoxinbildung bei geimpften Lämmern und Kälbern war unterschiedlich. Kälber reagierten mit zwei- bis dreimal so hohen Antitoxintitern gegen das C- und D-Toxin, wie Lämmer. Probleme ergaben sich hinsichtlich des Revaccinationstermins. Der ideale Zeitpunkt für das β -Toxoid lag bei 2 Wochen und für das ϵ -Toxoid bei 6 Wochen (41).

Ein polyvalenter Impfstoff gegen Leptospiren wurde bisher nur beim Meerschweinchen erprobt. Die Vaccine hatte folgende Zusammensetzung: *L.canicola* 1126, *L.pomona* (Michigan) und *L.hyos guidae* VCB. Die Impfkeime wurden durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen inaktiviert. Nach subcutaner Impfung waren die Meerschweinchen gegen eine tödliche intraperitoneale Infektion mit *L.canicola* und *L.hyos guidae* vollständig geschützt, nur im Falle von *L.pomona* kam es bei den Impfungen noch zu Temperaturanstiegen und zur Keimausscheidung über den Urin (74).

2.4. Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe

2.4.1. Eigenschaften

Die Herstellung von numerisch-additiven Kombinationsimpfstoffen erfolgt weniger aus epidemiologischen oder pathogenetischen, sondern mehr aus technischen Überlegungen heraus. Jede Komponente der numerisch-additiven Kombinationsvaccinen ist als Einfachimpfstoff voll wirksam. Die Kombination mit anderen Antigenen wurde vor allem wegen der Verringerung von Impfkosten, Senkung der Zahl der Impfungen und Erhöhung des Durchimmunisierungsgrades in der Population vorgenommen.

2.4.2. Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle Infektionen

Bei den ausschließlich bakteriellen numerisch-additiven Kombinationsimpfstoffen in der Tiermedizin handelt es sich vor allem um Toxoidimpfstoffe gegen Clostridien-Toxine. Diese Vaccinen umfassen praktisch das ganze Spektrum der wichtigsten Clostridieninfektionen beim Tier. Die Zahl der kombinierten Toxoide schwankt zwischen 2 und 7. Beim Schaf gibt es z.B. Clostridienimpfstoffe, die Toxoide gegen den Nordischen Bradsot (*C.septicum*), die Lämmerdysenterie (*C.perfringens* B), den Struck (*C.perfringens* C), die Breinierenkrankheit (*C.perfringens* D), die Gasödemerkrankungen (*C.chauvoei*, *C.novyi* A, *C.septicum*), die Enterotoxämie (*C.perfringens* B, C, D) und Tetanus (*C.tetani*), oder gegen den Nordischen und Deutschen Bradsot und die Gasödemerkrankungen (*C.chauvoei*, *C.septicum*, *C.novyi* A und B), oder gegen die Gasödemerkrankungen und Tetanus (*C.novyi* und *C.tetani*) enthalten.

In der Rinderhaltung der BRD besitzen die Clostridienimpfstoffe nicht die Bedeutung, wie bei den extensiver gehaltenen Schafen. Außer dem Rausch- und Pararauschbrand (*C.chauvoei* und *C.septicum*) treten Clostridieninfektionen in Deutsch-

land beim Rind relativ selten auf.

Die Wirksamkeit der numerisch-additiven Clostridienimpfstoffe wird im Vergleich zu den Einfachimpfstoffen unterschiedlich beurteilt. In einem Dreifachimpfstoff aus C.perfringens C-, D- und C.novyi-Toxoid wurde die Antitoxinbildung gegen das C.perfringens D-Toxoid durch die anderen Toxoide gehemmt (61). Selbst durch eine Erhöhung der D-Toxoiddosis konnte die Immunantwort gegen das D-Toxoid nicht gesteigert werden. Bei einem numerisch-additiven Kombinationsimpfstoff aus den Toxoiden von C.perfringens A, C, D, C.oedematiens (C.novyi B), C.septicum und C.tetani lagen dagegen die postvaccinalen Antitoxintiter bei geimpften Kaninchen deutlich höher, als nach einer Impfung mit den einzelnen Toxoiden (88). Ohne Wirksamkeitsverlust im Vergleich zu den Einfachimpfstoffen ließen sich auch C.perfringens C-, C.septicum- und C.novyi-Toxoid, sowie C.novyi- und C.tetani-Toxoid in einer Vaccine kombinieren (12, 44, 45).

Die Toxoiddosen in den verschiedenen numerisch-additiven Clostridienimpfstoffen lassen sich schwer vergleichen, da für die Angaben unterschiedliche Einheiten verwendet wurden. Die Applikation numerisch-additiver Clostridienvaccinen kann subkutan (12, 88), intramuskulär (20) oder intraperitoneal (86), sowie via Aerosol (2) erfolgen. Thomson et al. (86) verglichen die subkutane, intramuskuläre und intraperitoneale Applikation, ohne Wirksamkeitsunterschiede festzustellen. Relativ einheitlich sind die Angaben bezüglich des Revaccinationszeitpunktes. Meistens liegen drei bis vier Wochen zwischen der Erst- und Zweitimpfung.

Bis auf wenige Ausnahmen enthalten alle numerisch-additiven Clostridienimpfstoffe Formoltoxoiden. Nur Sinha und Prasad (81), sowie Choman (20) immunisierten mit formalin-inaktivierten Bouillonkulturen von C.chauvoei und Pasteurellen, bzw. C.chauvoei, C.septicum und C.novyi. Als Impfstoffzusätze werden Kalialaun (83, 20), Mineralöl (81, 86, 88)

und Aluminiumhydroxid (12, 44, 45, 88) beschrieben. Der Zusatz von Mineralöl brachte das beste Immunisierungsergebnis, führte aber zu starken Lokalreaktionen, außer bei intraperitonealer Anwendung (86).

In Australien wurde ein Clostridientoxoidimpfstoff aus *C.perfringens* B, C, D, *C.septicum*, *C.novyi*, *C.chauvoei* und *C.tetani* mit einem Mittel gegen Schafrundwürmer versetzt. Dieses senkte den pH-Wert des Impfstoffes von pH 6,0 auf pH 3,5 und erhöhte die Wirkung der Clostridienvaccine beträchtlich, ohne selbst an Wirksamkeit zu verlieren. Ein Challenge mit über 200 MLD *C.chauvoei* bewies, daß nach 16 Wochen alle Tiere völlig geschützt waren. Nach 32 Wochen überstanden nur mehr die Schafe die Testinfektion, in deren Vaccine das Wurmmittel enthalten war (35).

Neben den ausschließlichen Clostridienimpfstoffen wird von Katitch (40) eine numerisch-additive Kombinationsvaccine beschrieben, die außer den mit Alaun gefällten Kulturen von *C.perfringens* C, *C.novyi* B und *C.septicum* noch zusätzlich *S.abortus ovis* Antigene enthält. Nach zweimaliger Immunisierung im Abstand von drei Wochen wurden innerhalb von 3 Jahren bei den geimpften Schafen keine Erkrankungen durch die in der Vaccine enthaltenen Erreger beobachtet. Vor der Impfung traten bei 25-55 % der Schafe durch *S.abortus ovis* ausgelöste Aborte und häufig Enterotoxämien auf.

Außer den vielen numerisch-additiven Kombinationsimpfstoffen gegen Clostridien-Toxine gibt es auch einen numerisch-additiven Kombinationsimpfstoff gegen die durch enterotoxische *E.coli*-Keime und Salmonellen ausgelösten Durchfallerkrankungen beim Kalb. Diese Vaccine besteht aus hitzeinaktivierten *E.coli*-Keimen der O-Gruppen 8, 9, 15, 26, 78, 137 und 139 und *S.dublin*- und *S.typhimurium*-Keimen und wird dem Milchaustauscher zur oralen Applikation zugesetzt. Auf diese Weise oral immunisierte Kälber erkrankten seltener an Durchfall, benötigten weniger

Behandlungen und nahmen besser an Gewicht zu, als nicht geimpfte Kontrolltiere (67).

2.4.3. Numerisch-additive Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle und virale Infektionen

Neben den numerisch-additiven Kombinationsvaccinen, die nur Bakterienantigene enthalten, gibt es auch Kombinationsimpfstoffe, in die zusätzlich noch Virusantigene aufgenommen wurden. Der bekannteste Impfstoff aus dieser Gruppe ist der Kombinationsimpfstoff für Hunde gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis (H.c.c.), Leptospirose und Tollwut. Die Bakterienkomponente kann entweder nur mit Staupe- und H.c.c.-Virus oder zusätzlich, bzw. allein mit dem Tollwutvirus kombiniert werden (Candur^RSHL, Epivax^RSH+L/ Epivax^RLT/ Canivac^RSHL, Epivax^RSH+LT, Canimed^RSH+LT). Die Bakterienkomponente besteht aus formalin-inaktivierten Keimen (ca. 4×10^8 bis $5,8 \times 10^9$) von *Leptospira canicola* und *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Bei den Viruskomponenten handelt es sich entweder um inaktivierte (Tollwut) oder um attenuierte Viren (Staupe, H.c.c.). Die Kombinationsvaccine ist genauso wirksam, wie die entsprechenden Einfachimpfstoffe (1, 26, 38, 58), im Gegenteil, bei einzelnen Komponenten wurden nach Impfung mit der Kombinationsvaccine sogar höhere postvaccinale Antikörpertiter ausgebildet, als nach Einfachimpfung (58). So hatten Welpen nach einmaliger Immunisierung mit der Kombinationsvaccine höhere Serum-Neutralisationstiter gegen Tollwut ausgebildet als nach alleiniger Tollwutimpfung (8).

Ein wichtiger numerisch-additiver Kombinationsimpfstoff beim Pferd ist die Vaccine gegen Tetanus und Influenza. Dieser Adsorbatimpfstoff besteht aus Tetanus-Toxoid und den inaktivierten Influenza A equi 1- und 2- Viren (Fluvac T, Fort Dodge; Duvexyn T, Duphar T; Prevacun T, Behring). Beim Vergleich der Kombinationsimpfstoffe mit den entsprechenden Einfachimpfstoffen der drei Firmen, gab es Unterschiede. Beim amerikanischen und deutschen Präparat

waren Kombinationsimpfstoff und Einfachvaccine gleich gut in ihrer immunisierenden Wirkung, die Kombinationsvaccine von Duphar war geringgradig schwächer immunogen als der Einfachimpfstoff (14). Prevacun T immunisierte sogar etwas besser als der entsprechende monovalente Tetanusimpfstoff (37). Brun et al. (15) beschrieben mit allen Kombinationsimpfstoffen aus Influenza-Viren und Tetanus-Toxoid zufriedenstellende Immunisierungsergebnisse.

2.5. Funktionell-synergistische Kombinationsimpfstoffe

2.5.1. Eigenschaften

Die funktionell-synergistischen Kombinationsimpfstoffe wurden zur Bekämpfung der infektiösen Faktorenkrankheiten entwickelt. Sie unterscheiden sich von den anderen Kombinationsimpfstoffen durch die Abhängigkeit ihrer Wirkung von dem synergistischen Miteinander mehrerer Antigenkomponenten. Gegen alle "Leitkeime" eines Infektionsgeschehens muß eine belastbare Immunität erzeugt werden, aber es ist nicht notwendig und auch nicht möglich, mit der funktionell-synergistischen Kombinationsvaccine den Impfling gegen alle am Zustandekommen der infektiösen Faktorenkrankheiten beteiligten Erreger zu immunisieren. Wichtig ist lediglich, daß durch die Impfung mit der funktionell-synergistischen Kombinationsvaccine die Basisinfektionen, sowie die regelmäßig mit ihnen korrespondierenden Partnerinfektionen verhindert werden. "Eine derart breit gefächerte Immunität unterbricht die Kette der möglichen synergistischen Interaktionen zwischen den ubiquitär verbreiteten, schwach virulenten Erregern und verhindert damit die Entwicklung von infektiösen Faktorenkrankheiten" (55, 56, 57).

Der funktionell-synergistischen Kombinationsvaccine wird zusätzlich eine pararaspezifische Wirkung zugeschrieben. Diese Wirkung ist nach Mayr (55) mit einem Abwehrnetz zu vergleichen, dessen Maschen so dicht sind, daß sich darin auch Erreger verfangen, gegen die nicht immunisiert wurde.

2.5.2. Funktionell-synergistische Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle Infektionen

Die meisten der bekannten funktionell-synergistischen Kombinationsimpfstoffe enthalten nur Viruskomponenten. Funktionell-synergistische Impfstoffe gegen bakterielle Erreger sind relativ selten, da für die Entstehung von infektiösen Faktorenkrankheiten primär Viren verantwortlich sind und Bakterien nur als Sekundärkeime eine Rolle spielen.

Ausschließlich bakterielle, funktionell-synergistische Kombinationsimpfstoffe sind die meisten Pasteurella multocida- und Pasteurella haemolytica-Impfstoffe für Rinder, denn ihr Einsatzgebiet richtet sich heute nicht mehr auf die primären Pasteurellosen wie z.B. die Wild- und Rinderseuche, sondern auf die sekundären Pasteurellosen im Rahmen des Rindergrippekomplexes. Eine bereits im Handel erhältliche Vaccine gegen die sekundäre Pasteurellose des Rindes ist die Pasteurella-Adsorbat-Vaccine "Dessau" aus formalininaktivierten P.multocida A-, B-, D- und P.haemolytica-Keimen (90). Ein anderer im Versuchsstadium befindlicher Impfstoff gegen Rinder-grippe ("shipping fever") setzt sich aus P.multocida A, D und P.haemolytica Typ 1, 4, 6 und 7 zusammen. Die Inaktivierung der Pasteurellen erfolgte dabei entweder mit Formalin, mit Merthiolat oder durch Hitze. Nach zweimaliger Impfung mit den chemisch inaktivierten Keimen bildeten Kaninchen die höchsten Antikörpertiter aus. Die dreimalige Impfung schützte Schafe für 20 Wochen vor der Infektion. Die einzelnen Pasteurellen-Stämme immunisierten verschieden gut und zwar grundsätzlich P.haemolytica-Stämme schlechter als P.multocida-Stämme (17).

Ein großes Problem in Schweinezuchten ist die atrophische Rhinitis. Sie wird neben anderen Faktoren durch Bordetella bronchiseptica, P. multocida und wahrscheinlich noch einige andere Keime ausgelöst (28). Schuller et al. (80) und Eliás mit Szent-Iványi (29) versuchten Schweine mit einem Adsorbat-Impfstoff auf der Basis von glutaraldehyd-

inaktivierten Pasteurellen und Bordetellen gegen die Rhinitis atrophicans zu immunisieren. Schuller impfte dazu Muttersauen 4 Wochen ante partum mit $1,67 \times 10^{10}$ Keimen. Die Bordetella-Antikörpertiter der Ferkel geimpfter Sauen lagen kurz nach der Geburt ebenso hoch wie diejenigen ihrer Mütter (1:128-1:2048). Sie fielen aber bis zur 10. Lebenswoche auf 1:128 ab. Die Pasteurellentiter (KBR) waren etwas niedriger (1:128-1:256), zeigten aber den gleichen Titerverlauf. Bei der Schlachtung konnten Conchienveränderungen bei 23 % der Ferkel von geimpften Sauen und bei 72,9 % der Ferkel von ungeimpften Muttertieren festgestellt werden. Der Autor empfiehlt eine Revaccinierung der Ferkel bei der Aufstallung in stark gefährdeten Mastbetrieben. Eliás (29) impfte sowohl Sauen (20×10^9 Keime) als auch Ferkel (5×10^9 Keime) 2mal mit B.bronchiseptica und P.multocida im Abstand von 14 Tagen und stellte danach die höchsten Titer fest. Aber auch er betont, daß nur die Erkrankungshäufigkeit gesenkt werden kann, die Erreger jedoch nicht durch die Impfung auszurotten sind. Zum selben Ergebnis kamen auch andere Autoren bei Versuchen mit Rhinovac^R (TAD/Cuxhaven). Mit dieser im Handel erhältlichen Vaccine aus $1,67 \times 10^9$ B.bronchiseptica- und $1,67 \times 10^9$ P.multocida-Keimen mit 10,2 mg Aluminiumhydroxid und 0,1 mg Thiomersal pro ml wird die Impfung der Muttersauen empfohlen. Der Erfolg der Impfung entspricht der Wirkung einer Tylosintherapie bei geringeren Kosten und ohne daß Antibiotikaresistenzen stören könnten (79, 92).

2.5.3. Funktionell-synergistische Kombinationsimpfstoffe gegen bakterielle und virale Infektionen

Mit einem funktionell-synergistischen Kombinationsimpfstoff aus attenuierten Parainfluenza-3-Viren (PI-3) und formalininaktivierten P.multocida- und P.haemolytica-Keimen wurden Kälber im Alter von 4- 10 Wochen und mit etwa 4 Monaten immunisiert. Nach der Impfung setzte man die Kälber einem Temperaturstreß aus (Unterbringung für 24 Stunden in einem Raum mit 38°C und anschließend auf offenem

Wagen mehrmaliges Naßspritzen in rauhem Wetter) und belastetes 24 Stunden später via Aerosol mit allen 3 Erregern. Nach der Testinfektion starben alle Kontrolltiere, während 2/3 der Impflinge überlebten (50). Hamdy und Trapp (33) verglichen die Wirksamkeit von 2 funktionell-synergistischen Vaccinen, die sich aus formolinaktivierten PI-3-Viren von 4 verschiedenen Stämmen und 2 unterschiedlichen Pasteurellenanteilen zusammensetzten. Im Impfstoff I war ein P.multocida-Bacterin (Fa. Wellcome) und im Impfstoff II formalininaktivierte P.haemolytica- und P.multocida-Keime enthalten. Nach zweimaliger Impfung im Abstand von 3 Wochen wurden die geimpften Kälber nach einem Temperaturstreß mit P.haemolytica- und P.multocida-Keimen und mit allen 4 Parainfluenzavirus-Stämmen belastet. Von 3 mit Impfstoff I geimpften Kälbern reagierten 2 und von den 4 mit Impfstoff II nur eines mit Temperaturerhöhungen und respiratorischen Symptomen. Bei allen Kälbern konnten PI-3-Viren und Pasteurellen aus der Nase reisoliert werden, jedoch bei den Impflingen in deutlich geringerer Menge und über einen wesentlich kürzeren Zeitraum als bei den nicht geimpften Kälbern.

Manchmal werden funktionell-synergistischen Kombinationsimpfstoffen für Rinder auch Antigene spezifischer Infektionserreger zugesetzt. In USA wurde eine Kombinationsimpfung entwickelt, die aus attenuierten IBR- und PI-3 Viren besteht, wobei zusätzlich die Virusanteile in einer Suspension aus formalininaktivierten Pasteurellen gelöst werden. Der Pasteurellenanteil dient laut Hersteller nur zur Suspendierung der Virusanteile. Aus diesem Grund liegen auch keine Wirksamkeitsuntersuchungen bezüglich der Pasteurellen-Komponente vor (72, 73). Matsuoka et al. (51) prüfte verschiedene Impfstoff-Zusammensetzungen, bei denen der Pasteurella-Anteil nur als Adjuvans dienen sollte. Eine zweimalige Impfung im Abstand von 3 Wochen mit formalininaktivierten PI-3-Viren und P.haemolytica- und P.multocida-Keimen oder an Stelle der PI-3-Viren mit formalininaktivierten IBR-Viren stimulierte die gleichen Virusantikörpertiter wie

eine zweimalige Impfung mit einem Impfstoff aus allen 3 Komponenten (PI-3 - IBR - Pasteurellen).

Mayr et al. (52) entwickelten für das Kalb und Rind einen funktionell-synergistischen Kombinationsimpfstoff, der neben PI-3- und MD/VD-Virusanteilen auch eine vollwertige *P.haemolytica* Komponente (formalininaktivierte Keime) enthielt. Nach der Kombinationsimpfung lagen die *P.haemolytica*-Antikörpertiter um eine Verdünnungsstufe niedriger als bei alleiniger *P.haemolytica*-Impfung. Wurden alle drei Komponenten simultan appliziert, waren die Pasteurellen-Titer am höchsten.

Von Ungureamu et al. (89) wird eine Kombinationsvaccine aus formalininaktivierten IBR-, MD/VD- und PI-3-Viren, sowie formalininaktivierten *P.multocida* A-, B-, D- und *P.haemolytica* A₁-, A₅-, A₆-, T₄-Keimen beschrieben. Nach zweimaliger Immunisierung von Kälbern (1. Impfung im Aufzuchtbetrieb und 2. Impfung im Mastbetrieb) ließ sich die durch Pneumopathien bedingte Verlustrate in Kälbermastbetrieben um 50 % senken.

Ein anderer bereits im Handel erhältlicher Impfstoff gegen Rindergrippe enthält attenuierte IBR- und PI-3 Viren (Rhivax-P^R, Pitman-Moore) in Verbindung mit inaktivierten, bzw. inaktivierten und "detoxifizierten" *P.multocida*- und *P.haemolytica*-Keimen (Pfizer-Bacterine). Nur durch detoxifizierte Pasteurellen-Antigene wurden Pasteurellen-Antikörpertiter ausgelöst. Dafür waren die viralen Antikörpertiter bei Impfung mit den detoxifizierten Pasteurellen niedriger als nach Verwendung "normaler" Pasteurellen-Antigene. Die Schutzrate gegenüber den Viruserkrankungen lag jedoch bei beiden Impfstoffen nicht wesentlich unter dem Niveau der rein viralen Vaccination (47).

Für Hunde gibt es eine funktionell-synergistische Vaccine gegen die infektiöse Tracheobronchitis. Der Impfstoff enthält avirulente *Bordetella bronchiseptica*-Keime ($3-4 \times 10^8$) und attenuiertes, canines Parainfluenza-Virus

($10^{4,3}$ TCID₅₀). Nach nasaler Applikation waren die Hunde gegen eine Testinfektion mit virulenten B.bronchiseptica-Stämmen und Parainfluenza-Virus geschützt. Die einmalige, intranasale Impfung stimulierte auch die Bildung von Agglutinationstitern gegen B.bronchiseptica und Neutralisationstitern gegen das canine Parainfluenza-Virus (19, 39).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere

Für die Immunisierungsversuche standen 95 Ferkel mit einem durchschnittlichen Alter von 6 Wochen bei Versuchsbeginn und 10 erwachsene Affen der Art *Macaca irus* beiderlei Geschlechtes zur Verfügung. Die Ferkel wurden konventionell gehalten und erhielten Ferkelstarterfutter und Wasser ad libitum. Die Makaken wurden jeweils zu zweit in Gitterkäfigen gehalten und mit Pellets, Früchten und Wasser ernährt.

Die Toxinneutralisationsversuche wurden an jungen, 10-12 Gramm schweren weiblichen NMRI-Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen gehalten und mit Pellets und Leitungswasser ad libitum gefüttert.

3.1.2. Impfstoffe

Bei den für die Impfstoffherstellung verwendeten Toxoiden handelte es sich um gereinigte, mit Formalin inaktivierte Toxine, und zwar um C.tetani-Toxoid der Fa. Behringwerke AG (Charge 751 753 A, mit 1000 Lf¹⁾/ml), C.novyi A-Toxoid derselben Firma (80 BE²⁾/ml) und C.perfringens A-Toxoid der Fa. Wellcome (Charge Nr. NN7278 mit 9,5 Lf/ml).

Die Toxoide wurden entweder als monovalente oder trivalente Vaccine verimpft. Die Impfdosis betrug für das Ferkel in der trivalenten bzw. jeweiligen monovalenten Vaccine 50 Lf Tetanus-Toxoid, 40 BE Novyi-Toxoid und 4,25 Lf Perfringens-Toxoid. Der Impfstoff für die Affen setzte sich aus 12 Lf Tetanus-Toxoid, 10 BE Novyi-Toxoid und 4,25 Lf Per-

1) Lf = Limes flocculationis

2) BE = Bindungseinheiten

fringens-Toxoid zusammen. Ein Teil der Impfstoffe enthielt Aluminiumhydroxid in einer Konzentration von 0,2% (Behringwerke AG, Op. Nr. 10568, 2%). Die Applikation der Vaccine erfolgte intramuskulär. Der Abstand zwischen den beiden Impfungen variierte von zwei bis vier Wochen.

3.1.3. Blutentnahme

Die Blutentnahme an den immunisierten Versuchstieren wurde vor der ersten, zum Zeitpunkt der zweiten Impfung und 14 bis 28 Tage nach der zweiten Impfung durchgeführt. Bei einem Teil der Versuchstiere erfolgten wiederholte Entnahmen. Bei den Ferkeln gewannen wir das Blut aus der vorderen Hohlvene, bei den Affen aus der Vena femoralis nachdem die Affen mit 0,5 - 0,8 ml Vetalar^R (intramuskulär) betäubt worden waren.

Das Blut wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag bei 3 000 UpM zentrifugiert. Die Sera lagerten bei -20°C. Vor Durchführung der serologischen Untersuchungen wurden die Sera bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert.

3.1.4. Antitoxinnachweis

3.1.4.1. ELISA

Als Antigene zur Plattenbeschichtung dienten bei Tetanus und Novyi dieselben Toxoide wie zur Immunisierung, bei Perfringens dagegen das nicht inaktivierte Toxin. Die Antigengebrauchsverdünnung in Karbonat/Bikarbonatpuffer (pH 9,6) lag für die verwendeten Antigene bei 1:10 000 = 0,1 Lf/ml für das Tetanus-Toxoid, 1:20 = 4 BE/ml für das Novyi-Toxoid und 1:100 = 0,08 Lf/ml für das Perfringens-Toxin. 0,1 ml der Antigenverdünnungen wurde in die Vertiefungen der Flachbodenplatten (M 129 A, Flow Laboratories, Bonn) pipettiert. Die Platten wurden anschließend 3 Stunden bei 37°C inkubiert, mit Tesafilm verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach dreimaligem Waschen der Platten mit NaCl-Phosphat-puffer plus Tween (8 g NaCl + 0,2 g KH_2PO_4 + 2,9 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O + 0,2 g KCL pro 1 l Aqua dest. + 0,05 % Tween 20) beschickten wir die Vertiefungen mit je 0,1 ml der in zweier Stufen mit NaCl-Phosphat-Lösung plus Tween verdünnten Sera. Zur Kontrolle liefen jeweils ein positives und ein negatives Serum mit. Nach einstündiger Bebrütung bei 37°C wuschen wir die Platten viermal und beschickten sie mit je 0,1 ml der Gebrauchsverdünnung (in NaCl-Phosphat-Lösung ohne Tween, mit 5 % foetalem Kälberserum) des tierartspezifischen Konjugates. Es handelte sich dabei um Peroxidase-anti-porcine der Fa. Miles Yeda in einer Gebrauchsverdünnung von 1:500 und ein Anti-Affen-Konjugat der Fa. Nordic (RAMon/IgG (H+L) PO, Nr. 27-1180), das wir in einer Verdünnung von 1:4 000 verwendeten. Nach erneuter einstündiger Bebrütung bei 37°C und viermaligem Waschen erfolgte die Zugabe von je 0,1 ml Substrat (0,5 g p-Phenyldiamin der Fa. Sigma, München + 4,67 g Zitronensäure + 9,15 g Na_2HPO_4 pro 1 l Aqua dest., kurz vor Gebrauch Zugabe von 0,005 % H_2O_2). Die Platten wurden etwa 10 Minuten im Mikro-Shaker von Dynatech geschüttelt und bis zur Ablesung bei 510 nm im Multiscan-Photometer (Flow Laboratories, Bonn) eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert.

3.1.4.2. Neutralisationstest

Die Neutralisationsversuche konnten nur mit C.tetani- und C.novyi-Toxin durchgeführt werden, weil die Toxizität des C.perfringens-Toxins für die Mäuse zu gering war.

Die zu prüfenden Sera wurden mit steriler physiologischer NaCl-Lösung in 2er Stufen verdünnt. Zu einem Teil Serumverdünnung wurden 2 Teile Toxin gegeben und die Gemische 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. 10-12 g schwere Mäuse erhielten von den Gemischen 0,3 ml intraperitoneal injiziert. Die verwendete Toxindosis betrug 0,28 Lf Tetanus-Toxin, bzw. 0,0775 Lf Novyi-Toxin. Die Toxindosis war so gewählt, daß die Kontrolltiere innerhalb von 3 Tagen starben.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Untersuchungen beim Ferkel

Zur Wirksamkeitsbestimmung der Kombinationsvaccine "Tetanus-Gasbrand" wurden Ferkel zweimal im Abstand von zwei Wochen intramuskulär immunisiert und anschließend die postvaccinalen Antitoxintiteranstiege mit dem ELISA bestimmt. Um eventuelle Wirksamkeitsverluste nach der Kombination der drei Toxoide feststellen zu können, liefen Impfgruppen, die mit den entsprechenden monovalenten Toxoiden geimpft wurden, parallel. Die Ergebnisse der zweimaligen monovalenten bzw. trivalenten intramuskulären Impfung gegen Tetanus und Gasbrand bei Ferkeln sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die Tetanus-Antitoxintiter nach einmaliger Impfung mit dem Tetanus-Toxoid lagen bei 1:4 und nach zweimaliger Impfung bei 1:64. Nach Immunisierung mit der trivalenten Vaccine stiegen die Antitoxintiter etwas stärker an und zwar auf 1:8 nach einmaliger, bzw. 1:128 nach zweimaliger Impfung. Für *C.perfringens* ließen sich nach einmaliger Impfung noch keine postvaccinale Antitoxine nachweisen, gleichgültig, ob mit der monovalenten, oder mit der trivalenten Vaccine immunisiert wurde. Erst 10 Tage nach der Boosterimpfung waren Antitoxine festzustellen und zwar in einer Höhe von 1:11 (monovalente Impfung) und 1:32 (trivalente Impfung).

Relativ niedrige Antitoxintiter fanden wir nach einmaliger, intramuskulärer Impfung auch mit Novyi-Toxoid. Die Titer betrugen 1:4 nach monovalenter und 1:8 nach trivalenten Impfung. Die Boosterimpfung führte zu einem starken Titeranstieg auf 1:256, während bei den mit der monovalenten Vaccine geimpften Tieren der mittlere Titer nur 1:32 betrug.

Aus anderen Immunisierungsversuchen ist bekannt, daß sich die Wirksamkeit von Clostridienvaccinen durch den Zusatz von Aluminiumhydroxid wesentlich steigern läßt. Die Immunisierungsversuche beim Schwein mit einer Adjuvansvaccine hatten das Ziel, die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse zu prüfen und die Unschädlichkeit der Tetanus-Gasbrand-Adsorbatvaccine beim Schwein zu kontrollieren. Dazu wurden Schweine zweimal im Abstand von 14 Tagen mit der Tetanus-Gasbrand-Vaccine mit und ohne Zusatz von Aluminiumhydroxid geimpft und zu verschiedenen Zeiten p. vacc. ihre Antitoxintiter im Serum mit dem ELISA bestimmt.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich wird, lagen die mittleren Antitoxintiter für die 3 Clostridientoxoide bei den mit der Aluminiumhydroxid-Vaccine geimpften Ferkeln über den Werten der Tiere, die mit der Vaccine ohne Aluminiumhydroxid geimpft wurden. Die Tetanus-Antitoxintiter stiegen z.B. nach Impfung mit der "Aluminiumhydroxid-Vaccine" auf einen Wert von 1:92 (14 Tage nach Revaccination), im Gegensatz zu 1:32 nach Impfung ohne das Adjuvans.

Für das Novyi-Toxoid ergab sich 14 Tage nach der Revaccination ein Unterschied in den Antitoxintitern von 1:512 (Aluminiumhydroxid-Vaccine) zu 1:64 ("normale" Vaccine) bzw. für das Perfringens-Toxoid von 1:32 zu 1:8.

Die Ergebnisse bestätigen die gute Wirksamkeit der Gasbrand-Tetanus-Vaccine mit Aluminiumhydroxid beim Schwein. Da auch bezüglich der Verträglichkeit keine Unterschiede zur Vaccine ohne Aluminiumhydroxid bestanden, wurde diese für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Ein anderer wichtiger Faktor, der die Wirksamkeit einer Impfung beeinflussen kann, ist der Zeitpunkt der Revaccination. Zur Bestimmung des optimalen Revaccinationstermins für die "Gasbrand-Tetanus-Vaccine" wurde je eine Schweinegruppe 14, 21 und 28 Tage nach der Erstimpfung revacciniert. Um eventuelle Unterschiede in den postvacci-

nalene Antitoxintiter zwischen den monovalenten und trivalenten Impfstoffen aufzudecken, wurden die Impfungen sowohl mit der Kombinationsvaccine als auch mit den entsprechenden monovalenten Impfstoffen durchgeführt. Die Ergebnisse der Antitoxinbestimmung sind in den Tabellen 3 bis 5 im Einzelnen aufgeführt. Die Antitoxintiterverläufe der mit der Kombinationsvaccine geimpften Tiere wurden zusätzlich in Abb. 1 graphisch dargestellt.

Beim Vergleich der C.tetani-Antitoxintiter am 60. Tag nach der Impfung ergab sich eine deutliche Überlegenheit für die Revaccination am 28. Tag nach der Erstimpfung (vgl. Tab. 3 und Abb. 1). Bei den früheren Revaccinationsterminen (14. und 21. Tag p. primovacc.) kommt es zwar auch zu einer Boosterreaktion, der Antitoxintiteranstieg ist aber deutlich schwächer und der Antitoxintiter fällt auch viel schneller ab, als bei einer Revaccination am 28. Tag.

Unterschiede zwischen den Impfungen mit Tetanus-Toxoid allein oder in Kombination mit dem Novyi- und Perfringens-Toxoid ließen sich dagegen nicht feststellen.

Auch im Falle des C.novyi-Toxoids wiesen die Schweine, die erst 4 Wochen nach der Erstimpfung revacciniert wurden, die höchsten Antitoxintiter am 60. Tag p. primovacc. auf (vgl. Tab. 4 und Abb. 1). Der mittlere Antitoxintiter lag in dieser Gruppe bei 1:516 bzw. 1:456 am 31. Tag p. revacc. Im Gegensatz zu C.tetani erreichte die Tiergruppe, die schon 3 Wochen nach der Erstimpfung revacciniert wurde bei C.novyi genauso hohe Titer (1:512 und 1:456) wie die Tiere, die nach 4 Wochen revacciniert wurden. Nur bei einem zweiwöchigen Intervall zwischen Erst- und Zweitimpfung lagen die mittleren Antitoxintiter am 60. Tag p. primovacc. deutlich niedriger. Die Antitoxintiter stiegen zwar in dieser Gruppe kurzzeitig auch bis auf 1:286 (14 Tage p. revacc.) an, fielen dann aber sehr schnell bis auf 1:8 am 60. Tag p. vacc. ab.

Die Ergebnisse bei *C.perfringens* unterscheiden sich von denen bei *C.tetani* und *C.novyi* dadurch, daß nach der Erstimpfung überhaupt keine Antitoxintiter nachgewiesen werden konnten (vgl. Tab. 5 und Abb. 1). Nach der Revaccination kam es aber bei allen drei Revaccinationsterminen zu einem meßbaren Antitoxintiteranstieg. Der Anstieg war dabei umso höher, je länger der Zeitabstand zwischen Erst- und Zweitimpfung ausgedehnt wurde. Der höchste Endtiter von 1:128 (60. Tage p. primovacc.) wurde bei einem vierwöchigen Zeitabstand zwischen den beiden Impfungen festgestellt. Den niedrigsten Antitoxintiter (1:10) erhielten wir bei einem 14-tägigen Intervall zwischen Erst- und Zweitimpfung. Zwischen diesen beiden Ergebnissen lag der Antitoxintiter (1:36) bei einer Revaccination 3 Wochen nach der Erstimpfung.

Wie bei *C.tetani* war auch bei *C.novyi* und *C.perfringens* kein Unterschied zwischen den Immunisierungsergebnissen mit der Kombinationsvaccine und der monovalenten Vaccine festzustellen.

In den bisherigen Versuchen wurde zum Nachweis der postvaccinalen Antitoxintiter bei Ferkel und Affe der ELISA verwendet, weil diese Nachweismethode schnell durchführbar und gut reproduzierbar ist. Für den Wirksamkeitsnachweis von Clostridienvaccinen sind letztlich die Neutralisationstiter von entscheidender Bedeutung. Der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern ist aber relativ aufwendig und deshalb für den routinemäßigen Nachweis bei größeren Probenzahlen ungeeignet. Es wurde deshalb an einer begrenzten Serenzahl untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Neutralisations- und dem ELISA-Titer eines Serums besteht. In Tabelle 6 sind die Neutralisations- und ELISA-Titer von *C.tetani* und *C.novyi* einander gegenübergestellt. Im Falle *C.perfringens* konnte wegen der geringen Toxizität des *C.perfringens*-Toxins für Mäuse diese Untersuchung nicht durchgeführt werden.

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich wird, besteht zwischen den im ELISA- und Neutralisationstest gemessenen Antitoxin-

titern bei beiden Toxinen eine gute Korrelation. Der ELISA-Titer liegt zwar in einem höheren Titerbereich, die Titerunterschiede zwischen den verschiedenen Seren bewegen sich aber in der gleichen Größenordnung. Bei Tetanus entspricht z.B. ein ELISA-Titer von 1:64 einem Neutralisationstiter von 1:4. Liegt der ELISA-Titer vierfach höher, so steigt der Neutralisationstiter ebenfalls um das Vierfache. Im Falle Novyi korrespondiert ein ELISA-Titer von 1:128 mit dem Neutralisationstiter von 1:32. Man kann also vom ELISA-Titer direkte Rückschlüsse auf die toxinneutralisierende Kapazität eines Serums schließen.

Beim Vergleich der Tetanus- und Novyi-Ergebnisse fällt auf, daß für den gleichen Neutralisationstiter im Falle Tetanus ein höherer ELISA-Titer notwendig ist als im Falle Novyi. Die Ursache für diesen Unterschied kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht interpretiert werden. Es bedeutet aber, daß eine Übertragung der Ergebnisse innerhalb der verschiedenen Clostridientoxine nicht unbedingt möglich ist.

Tabelle 1: Antitoxintiter bei Ferkeln, die entweder allein oder kombiniert gegen C.tetani, C.perfringens und C.novyi intramuskulär immunisiert wurden

Impfstoff	Antitoxintiter ¹⁾ (ELISA)						
	Tetanus		Perfringens			Novyi	
	20 Tage nach der 1. Impfung	10 Tage nach der 2. Impfung	20 Tage nach der 1. Impfung	10 Tage nach der 2. Impfung	10 Tage nach der 2. Impfung	20 Tage nach der 1. Impfung	10 Tage nach der 2. Impfung
monovalent	1:4	1:64	neg.	1:11	1:4	1:32	
trivalent	1:8	1:128	neg.	1:32	1:8	1:256	

1) geometrisches Mittel (n = 10 pro Impfgruppe)

Tabelle 3: C.tetani-Antitoxintiter bei Ferkeln, die zweimal nach verschiedenen Zeitintervallen mit C.tetani-Toxoid allein oder in Kombination mit C.novyi- und C.perfringens-Toxoid immunisiert wurden.

Impfstoff	Zeitpunkt der Revaccination	C.tetani-Antitoxintiter 1) (ELISA)					
		Tage nach der Erstimpfung					
		0	14	28	38	60	
Tetanus-Toxoid	2 Wochen nach der Erstimpfung	neg.	1:4	1:24	1:24	1:6	
Tetanus-Novyi-Perfringens-Toxoid		neg.	1:6	1:32	n.d. ²⁾	1:16	
Tetanus-Toxoid	3 Wochen nach der Erstimpfung	neg.	1:8	1:56	n.d.	1:42	
Tetanus-Novyi-Perfringens-Toxoid		neg.	1:7	1:45	n.d.	1:36	
Tetanus-Toxoid	4 Wochen nach der Erstimpfung	neg.	1:4	1:8	1:284	1:312	
Tetanus-Novyi-Perfringens-Toxoid		neg.	1:4	1:6	1:251	1:384	

1) geometrisches Mittel (n = 10 pro Impfgruppe) 2) n.d. = nicht durchgeführt

Tabelle 4: C.novyi-Antitoxintiter bei Ferkeln, die zweimal nach verschiedenen Zeitintervallen mit C.novyi-Toxoid allein oder in Kombination mit C.tetani- und C.perfringens-Toxoid immunisiert wurden.

Impfstoff	Zeitpunkt der Revaccination	C.novyi-Antitoxintiter 1) (ELISA)					
		Tage nach der Erstimpfung					
		0	14	28	38	60	
Novyi-Toxoid	2 Wochen nach der Erstimpfung	neg.	1:4	1:32	1:45	1:16	
Novyi-Tetanus-Perfringens-Toxoid		neg.	1:16	1:286	1:286	1:8	
Novyi-Toxoid	3 Wochen nach der Erstimpfung	neg.	1:12	1:136	n.d. 2)	1:512	
Novyi-Tetanus-Perfringens-Toxoid		neg.	1:20	1:220	n.d.	1:456	
Novyi-Toxoid	4 Wochen nach der Erstimpfung	neg.	1:12	1:16	1:322	1:456	
Novyi-Tetanus-Perfringens-Toxoid		neg.	1:8	1:16	1:280	1:516	

1) geometrisches Mittel (n = 10 pro Impfgruppe) 2) n.d. = nicht durchgeführt

Tabelle 5: C.perfringens-Antitoxintiter bei Ferkeln, die zweimal nach verschiedenen Zeitintervallen mit C.perfringens-Toxoid allein oder in Kombination mit C.tetani- und C.novyi-Toxoid immunisiert wurden.

Impfstoff	Zeitpunkt der Revaccination	C.perfringens-Antitoxintiter 1) (ELISA)					
		Tage nach der Erstimpfung					
		0	14	28	38	60	
Perfringens-Toxoid	2 Wochen nach der Erstimpfung	neg.	neg.	neg.	1:8	1:8	
Perfringens-Tetanus-Novyi-Toxoid		neg.	neg.	1:8	1:8	1:10	
Perfringens-Toxoid	3 Wochen nach der Erstimpfung	neg.	neg.	1:32	n.d. ²⁾	1:40	
Perfringens-Tetanus-Novyi-Toxoid		neg.	neg.	1:14	n.d.	1:36	
Perfringens-Toxoid	4 Wochen nach der Erstimpfung	neg.	n.d.	neg.	1:48	1:96	
Perfringens-Tetanus-Novyi-Toxoid		neg.	n.d.	neg.	1:64	1:128	

1) geometrisches Mittel (n = 10 pro Impfgruppe) 2) n.d. = nicht durchgeführt

Abbildung 1: Antitoxintiterverläufe bei Ferkeln, die zweimal nach verschiedenen Zeitintervallen mit einer Kombination von C.tetani-, C.novyi-, und C.perfringens-Toxoid immunisiert wurden.

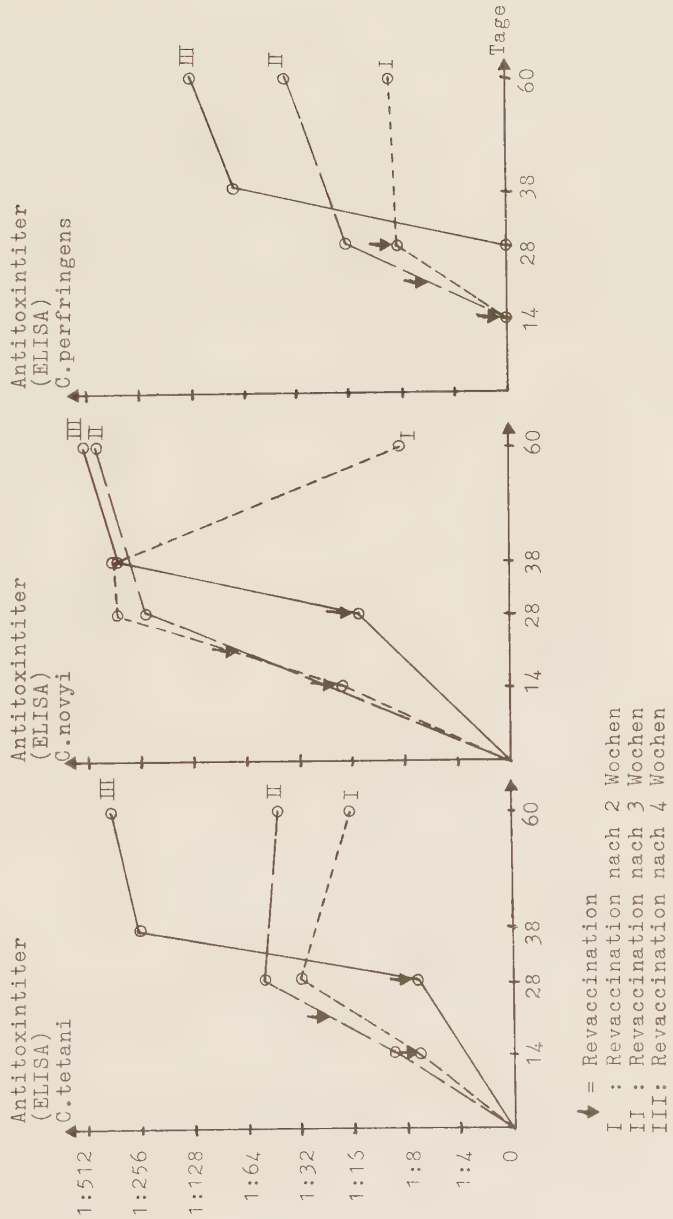


Tabelle 6: Ergebnis der Antitoxinbestimmung im Toxinneutralisationsversuch und ELISA bei Ferkeln, die mit C.tetani und C.novyi immunisiert wurden

Serum-Nr.	Tetanus-Antitoxintiter 14 Tage p. vacc.		Serum-Nr.	Novyi-Antitoxintiter 14 Tage p. vacc.	
	NT ¹⁾²⁾	ELISA		NT ¹⁾³⁾	ELISA
13c)	1:2	1:32	9b)	1:2	1:8
8c)	1:4	1:64	14c)	1:32	1:128
5c)	1:16	1:256	3c)	1:64	1:256

1) NT = Neutralisationstiter

2) Toxindosis-Tetanus = 0,28 Lf

3) Toxindosis-Novyi = 0,0775 Lf

3.2.2. Untersuchungen bei Affen

Nachdem die Unschädlichkeit und Wirksamkeit der C.tetani-, C.novyi- C.perfringens-Adsorbatvaccine beim Schwein nachgewiesen werden konnte, prüften wir diese Vaccine in einem begrenzten Versuch an Affen. Für diese Immunisierungsversuche wurde die Toxiddosis aufgrund unserer Ergebnisse bei den Ferkeln und unter Zugrundelegung der Erfahrungen mit der handelsüblichen Tetanus-Vaccine neu eingestellt, und zwar im Hinblick auf die Anwendung der Vaccine beim Menschen. Wir verwendeten 12 Lf Tetanus-Toxoid, dies entspricht der Dosierung der handelsüblichen Tetanus-Vaccine und bedeutet eine Verringerung der Ferkeldosis auf ein Viertel. Da die Novyi-Komponente beim Ferkel in der Wirksamkeit der Tetanus-Komponente entsprach, wurde die Novyi-Komponente in der Kombinationsvaccine für die Affen ebenfalls auf $1/4$, nämlich 10 BE reduziert. Unverändert blieb nur der Perfringens-Anteil mit 4,25 Lf, da die Immunantwort gegen Perfringens bisher am schwächsten war. Als Adjuvans wurde 0,2 % Aluminiumhydroxid zugesetzt. Einen Überblick über die Ergebnisse der Antitoxinbestimmung bei den Affenserum vor und nach der Impfung gibt die Abbildung 2.

Vor der Immunisierung waren die Affensera negativ. Nach der ersten Impfung stiegen die Antitoxintiter relativ schwach an und erreichten am 28. Tag p. vacc. bei allen 3 Toxoiden einen Titer von 1:6. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere ein zweitesmal immunisiert. Die Boosterimpfung stimulierte einen starken Titeranstieg und zwar bei C.tetani auf 1:84, bei C.novyi auf 1:60 und bei C.perfringens auf 1:55. Diese relativ hohen Antitoxintiter fielen bis zum 28. Tag nach der Boosterimpfung wieder etwas ab. Die gemessenen Antitoxintiter betrugen für Tetanus 1:26, für Novyi 1:18 und für Perfringens 1:16.

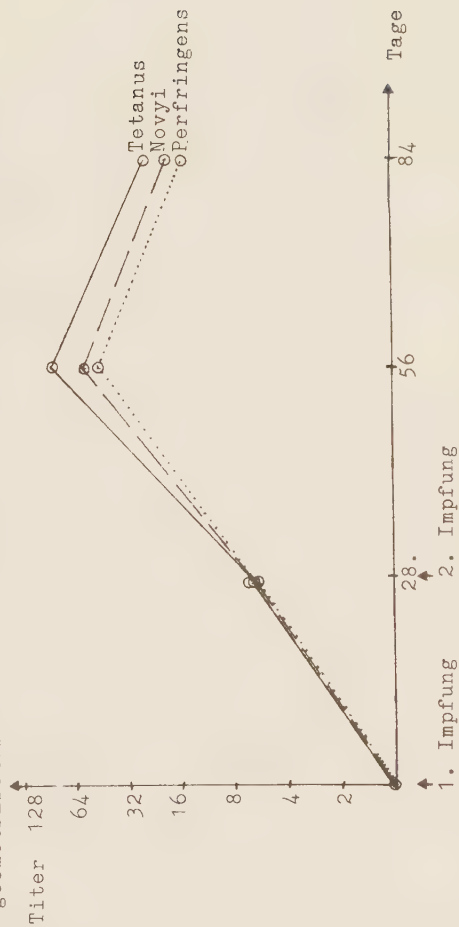
Die Ergebnisse der Antitoxinuntersuchungen bei den Affen bestätigen nachträglich die theoretisch vorgenommene Wahl der Toxiddosis für die letztlich zur Anwendung am

Menschen konzipierte Tetanus-Gasbrand-Vaccine, denn die postvaccinalen Titerbewegungen lagen bei den in der Vaccine enthaltenen drei Toxoiden praktisch in der gleichen Größenordnung.

Abbildung 2: Antitoxintiter von Affen, die zweimal im Abstand von 4 Wochen mit C.tetani-, C.novyi- und C.perfringens-Toxoid intramuskulär immunisiert wurden

Toxoid	Antitoxintiter (ELISA) ¹⁾			
	vor der Impfung	28.d p.1.Vacc. = 2.Vacc.	56.d p.1.Vacc. 28.d p.2.Vacc.	84.d p.1.Vacc. 56.d p.2.Vacc.
Tetanus	0	1:6	1:84	1:26
Novyi	0	1:6	1:60	1:18
Perfringens	0	1:6	1:55	1:16

1) geometrisches Mittel $n = 10$



4. Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich auf zwei Themenbereiche, nämlich einmal auf die Weiterentwicklung einer numerisch-additiven Kombinationsvaccine gegen Tetanus und Gasbrand und zum anderen auf die Ausarbeitung einer schnell durchführbaren und empfindlichen Nachweismethode für Antitoxine gegen das Tetanus-Toxin und die Gasbrandtoxine (Novyi A, Perfringens A).

Die Wirksamkeitsuntersuchungen einer Kombinationsvaccine beim Ferkel aus C.tetani-, C.novyi- und C.perfringens-Toxoid verliefen ähnlich positiv wie die ersten Untersuchungen bei der Maus (65). Die Immunantwort gegen die einzelnen Toxoide des Kombinationsimpfstoffes war nach Immunisierung mit der Kombinationsvaccine besser als nach Einfach-Impfung mit den jeweiligen Toxoiden. Von einem ähnlich positiven Ergebnis für die Entwicklung von Kombinationsimpfstoffen gegen Clostridien-Toxoide berichteten Choman et al. (20). Choman et al. wiesen nach Impfung mit einem trivalenten Impfstoff aus Toxoiden von C.chauvoei, C.septicum und C.novyi eine bessere Immunitätsbildung bei den geimpften Tieren nach, als nach Impfung mit den vergleichbaren monovalenten Toxoiden. Die Ursache für die bessere Wirksamkeit der kombinierten Clostridienvaccinen kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden. Eventuell spielt hier ein Adjuvanseffekt der Begleitantigene oder das Vorliegen gemeinsamer "Begleitantigene" eine Rolle. Man kann dieses Ergebnis aber nicht verallgemeinern, sondern muß dies von Fall zu Fall neu überprüfen. In einem von Nedjalkov et al. (61) entwickelten Dreifachimpfstoff aus C.perfringens C-, C-perfringens D- und C.novyi-Toxoid wurde z.B. nach der Kombinationsimpfung die Antitoxinbildung gegen das C.perfringens D-Toxoid unterdrückt.

Nachdem bei Maus und Ferkel festgestellt wurde, daß die Toxoide von C.tetani, C.novyi und C.perfringens ohne

Wirksamkeitsverlust kombiniert werden können, wurden in die Untersuchungen Affen miteinbezogen. Diese Untersuchungen hatten das Ziel, die Kombinationsvaccine soweit fortzuentwickeln, daß sie problemlos und mit möglichst geringem Risiko beim Menschen erprobt werden kann. Bei der Einstellung der Toxoiddosis für die Humanvaccine richteten wir uns nach dem Tetanus-Toxoid. Aufgrund jahrelanger Erfahrungen mit der Tetanus-Schutzimpfung weiß man, daß ca. 12 Lf Tetanus-Toxoid für die Ausbildung einer belastbaren Immunität ausreichen. Wir haben deshalb zunächst die Tetanus-Toxoiddosis in der Kombinationsvaccine auf 12 Lf festgelegt. An Hand der Ergebnisse mit dem Tetanus-Toxoid bei Maus und Ferkel ließ sich die Immunogenität der beiden anderen Toxoide bestimmen. Entsprechend der postvaccinalen Antitoxintiter bei Maus und Ferkel wurde in die Kombinationsvaccine zur Anwendung beim Menschen weniger Novyi-Toxoid, bzw. gleichviel Perfringens-Toxoid aufgenommen, als wir in der Kombinationsvaccine für das Ferkel verwendeten. Die Immunisierungsergebnisse beim Affen bestätigen die Richtigkeit dieser Überlegungen. Die postvaccinalen Antitoxintiter bei den immunisierten Affen lagen praktisch bei allen 3 Toxoiden auf dem gleichen Titerniveau.

Der Zusatz von Aluminiumhydroxid wirkte sich günstig auf die Wirksamkeit der Vaccine aus. Das Ergebnis mit der Adsorbatvaccine war wesentlich besser als das der Vaccine ohne Adjuvans. Das gute Ergebnis von Adsorbatvaccinen gegen Clostridien-Intoxikationen haben auch Bittner (12) bei einer Vaccine aus C.perfringens A-, C.novyi A- und C.septicum-Toxoid, sowie Klose und Schallehn (44, 45) mit einer Vaccine aus C.novyi- und C.tetani-Toxoid und Kennedy et al. (41) mit einer bivalenten Vaccine aus C.perfringens C- und D-Toxoid nachgewiesen. Eine noch stärkere Immunitätsverbesserung bringt der Zusatz von öligen Adjuvantien (88). Die öligen Adjuvantien führen aber zu starken lokalen und z.T. systemischen Reaktionen bei intramuskulärer und subkutaner Anwendung (83, 86) und sind deshalb zu riskant für Impfstoffe, die auf breiter Basis in der Praxis angewendet werden sollen.

Für die Höhe der postvaccinalen Antitoxintiter war neben dem Zusatz von Aluminiumhydroxid auch der Zeitpunkt der Revaccination ausschlaggebend. Der günstigste Termin für die Revaccination lag 4 Wochen nach der Erstimpfung. Dies stimmt im wesentlichen mit den Angaben für andere Clostridienimpfstoffe überein. Bittner (12) hält 3 bis 4 Wochen, Udovičić (88) und Katitch et al. (40) 3 Wochen, Jaeger und Barth (37) und Brun et al. (15) 4 Wochen, Hogarth-Scott (35) und Thomson et al. (86) 6 Wochen für den besten Abstand zwischen Erst- und Zweitimpfung. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kennedy et al. (41) verhielten sich die 3 Toxoide bezüglich des Revaccinationstermines einheitlich.

Der Wirksamkeitsnachweis für die numerisch-additive Kombinationsvaccine stützte sich im wesentlichen auf die Ergebnisse der Antitoxinbestimmung mit dem ELISA. Dieser Test wurde im Rahmen dieser Untersuchungen für alle 3 Toxoide ausgearbeitet und bewährte sich als schnelles und gut reproduzierbares Nachweissystem. Erfahrungen mit dem ELISA lagen bisher nur für die Bestimmung der Tetanus-Antitoxine vor (30, 31, 84). Wie aus den Untersuchungen ersichtlich wird, eignet sich der ELISA auch zum Nachweis von C.novyi- und C.perfringens-Antitoxinen. Der ELISA hat gegenüber der in früheren Untersuchungen bei der Maus verwendeten indirekten Hämagglutination den Vorteil, daß die Ergebnisse besser reproduzierbar sind. Bei der Hämagglutination wirkte sich vor allem die unterschiedliche Qualität der Hammelerythrozyten auf die Testergebnisse negativ aus (63). Außerdem war das C.perfringens-Toxoid stark und das C.novyi-Toxoid schwach hämolysierend, so daß die Beschichtung der Erythrozyten mit den Toxoiden praktisch unmöglich war.

Mit dem Neutralisationsversuch an ausgewählten Seren wurde nachgewiesen, daß den im ELISA gemessenen Antitoxintitern auch eine Aussagekraft über den Immunstatus zukommt. Seren mit entsprechenden Antitoxintitern schützten Mäuse gegen eine tödliche Toxindosis, während mit negativen

Seren vorbehandelte Mäuse an der Intoxikation starben. Die Stärke der Schutzwirkung war abhängig von der Höhe des ELISA-Titers. Wegen der geringen Toxizität des C.perfringens-Toxins für Mäuse konnte dieser Nachweis nur für das C.tetani- und C.novyi-Toxin geführt werden. Es ist aber anzunehmen, daß die im ELISA nachgewiesenen C.perfringens-Antitoxine ebenfalls neutralisierende Eigenschaften besitzen, wie die C.novyi- und C.tetani-Antitoxine. Die lineare Abhängigkeit der im ELISA nachgewiesenen Antitoxintiter von den im Mäuseschutzversuch bestimmten Neutralisationstitern wurde bei Seren vom Pferd (30, 84) und vom Menschen (31) im Falle der Tetanus-Antitoxine bereits früher bestätigt.

Das Ziel, eine im Tierversuch wirksame Vaccine gegen Tetanus und Gasbrand zu entwickeln für die Anwendung beim Menschen wurde erreicht. Auch die Unschädlichkeit der Kombinationsvaccine war voll gewährleistet, obwohl beim Ferkel die bis zu vierfache Toxoiddosis, die in der für den Menschen konzipierten Vaccine enthalten ist, verimpft wurde. Damit kann die im Rahmen dieser Untersuchungen entwickelte numerisch-additive Kombinationsvaccine für die klinische Prüfung beim Menschen freigegeben werden. Mit dem ELISA steht außerdem eine Nachweismethode zur Verfügung, die eine Wirksamkeitsprüfung beim Menschen möglich macht.

5. Zusammenfassung

In Immunisierungsversuchen bei 95 Ferkeln und 10 Affen wurde die Unschädlichkeit und Wirksamkeit einer numerisch-additiven Kombinationsvaccine gegen Tetanus und Gasbrand untersucht. Die Kombinationsvaccine setzte sich aus Formoltoxoiden von C.tetani, C.novyi A und C.perfringens A zusammen. Der Wirksamkeitsnachweis erfolgte durch die Antitoxinbestimmung bei postvaccinalen Sera mit dem ELISA und dem Neutralisationstest.

Die Unschädlichkeit der Kombinationsvaccine war bei intramuskulärer Applikation voll gewährleistet. Die geimpften Ferkel und Affen reagierten auf die Impfung weder mit Lokalreaktionen noch mit Störungen des Allgemeinbefindens.

In den Ferkelversuchen war das Immunisierungsergebnis mit der Kombinationsvaccine besser als mit den alleinigen Toxoiden. Die Antitoxintiter nach der Kombinationsimpfung lagen drei- bis achtmal so hoch wie nach den Einfachimpfungen. Der Zusatz von Aluminiumhydroxid zur Vaccine verbesserte das Immunisierungsergebnis. Der optimale Revaccinationstermin lag vier Wochen nach der Erstimpfung.

Eine zweimalige Immunisierung von Affen im Abstand von vier Wochen stimulierte mittlere Antitoxintiter von 1:84 (C.tetani), 1:60 (C.novyi) und 1:55 (C.perfringens).

Unter Zugrundelegung der Ergebnisse bei Ferkel und Affe wird für die Anwendung beim Menschen eine numerisch-additive Kombinationsvaccine folgender Zusammensetzung empfohlen: 12 Lf Tetanus-Toxoid, 10 BE Novyi-Toxoid und 4,25 Lf Perfringens-Toxoid mit 0,2 % Aluminiumhydroxid.

5. Summary

In immunization experiments using 95 piglets and 10 monkeys the harmlessness and effectiveness of a numerical additive combined vaccine against tetanus and gas gangrene were tested. The combined vaccine was composed of formol toxoids of *C.tetani*, *C.novyi* A, and *C.perfringens* A. Effectiveness was proven by means of antitoxin determination using post-vaccinal sera with the ELISA and the neutralization test.

Intramuscular application completely ensured the harmlessness of the combined vaccine. The vaccinated piglets and monkeys had neither a local reaction nor general health disorders due to the vaccination.

In the experiments using piglets, the immunization results were more effective with the combined vaccine than with single toxoids. The antitoxin titres were 3 to 8 times higher after the combined vaccination than after the monovalent vaccinations. Adding aluminium-hydroxide to the vaccine improved immunization results. Optimal time for revaccination was 4 weeks after primary vaccination.

Double immunization of monkeys with 4 week interval stimulated average antitoxin titres of 1:84 (*C.tetani*), 1:60 (*C.novyi*), and 1:55 (*C.perfringens*).

On the basis of the results using piglets and monkeys a numerical additive combined vaccine for human use is recommended which consists of the following: 12 Lf tetanus-toxoid, 10 BE novyi-toxoid, and 4,25 Lf perfringens-toxoid with 0,2 % aluminium-hydroxide.

Literaturverzeichnis

1. Ackermann, O. und L. Lang: Überprüfung der Wirksamkeit von Candivac^RSHL gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis (H.c.c.), Leptospirose und Tollwut von Hunden Kleintierpraxis 20, 205-214 (1975)
2. Aleksandrov, N.J., N.E. Gefen, N.B. Egorova, V.N. Efmerova, J.V. Vorontsov, I.N. Micošničenko: Aerosol revaccination with thyphoidbotulin A and B trivaccine and thyphoid tetanus-botulin A and B tetra-Vaccine using experimental animals Z.Mikrobiol. Epidemiol Immunobiol. 47 (5), 84-89 (1970)
Zit. nach Piendl D. (60)
3. Bain, R.V.S.: Hemorrhagic septicemia
FAO Agricultural Studies Nor. 62. (1963)
4. Baljer, G.: Orale Immunisierung neugeborener Ferkel gegen Escherichia coli
Tierärztliche Praxis 3, 417-423 (1975)
5. Baljer, G., S. Chorherr, H. Plank, H. Bostedt, H. Schels und A. Mayr: Orale, aktive Immunisierung neugeborener Kälber gegen Escherichia coli: Wirksamkeitsnachweis im Darmligaturtest und Feldversuch
Zbl. Vet. Med. B, 23, 364-373 (1976)
6. Baljer, G.: Possibilities and limitations of oral immunization against Escherichia coli in piglets and calves
Fortschr. Vet. Med. 29, 64-68 (1978)
7. Baljer, G.: Neue Erkenntnisse über die Wirksamkeit einer oralen Schutzimpfung gegen Escherichia coli
Fortschr. Vet. Med. 28, 337-346 (1977)
8. Barth, R. und O. Jaeger: Zur Prüfung der Immunitätsdauer von Tollwut-Kombinationsvaccinen am Hund
Blaue Hefte 57, 337-346 (1977)
9. Bertschinger, H.U., H. Jucker and H.P. Pfitzer: Control of Escherichia coli infection in weaned pigs by use of oral immunization combined with a diet low in nutrients
Fortschr. Vet. Med. 29, 73 (1978)

10. Bierer, B.W. and W.T. Derieux: Immunologic response of turkeys to an avirulent *Pasteurella multocida* vaccine in the drinking water.
2. Duration of immunity
Poultry Science 51, 1402-1408 (1972)
11. Bisping, W. und I. Dimitriadis: Versuche zur oralen Immunisierung von Hühnern mit hitzeinaktivierter *Salmonella*-Vakzine. I. Mitteilung: Impf- und Infektionsversuche an Hühnerküken
Zbl. Vet. Med. 15, 306 (1971)
12. Bittner, J.: Experimental prophylaxis of gas gangrene with monovalent and polyvalent toxoids
Bull. Off. int. Epiz. 59, 1605-1616 (1963)
13. Boge, B.: Erfahrungen mit der Immunprophylaxe bei Colidiarrhoen der Ferkel
Prakt. Tierarzt 60, 1089-1092 (1979)
14. Bommeli, W., J. Löhrer und H. Fey: Die Wirksamkeit der Pferde-Influenza-Impfstoffe mit Berücksichtigung des Tetanustoxoids der kombinierten Impfstoffe
Schweizer Arch. f. Tierheilkunde 122, 27-37 (1980)
15. Brun, A., C. Duret, B. Devaux, and D. Calmels:
Vaccinations simples, simultanées ou associées du cheval contre la grippe équine, la rage et la tétanos
Comp. Immunology, Microbiol. infect.
Dis. 3, 93-99 (1980)
16. Cameron, C.M. and W.J. P. Fuls: Immune response to dead and live *Escherichia coli* vaccines and colostral transfer of immunity to calves and lambs
Onderstepoort J. vet. Res. 37, 157-164 (1970)
17. Cameron, C.M. and G. Smit: Immune response of rabbits, mice and sheep to polyvalent *Pasteurella* vaccine
Onderstepoort J. vet. Res. 37, 217-224 (1970)
18. Cameron, C.M., L. Pienaar and A.S.M. Vermeulen:
Lack of cross-immunity among *Pasteurella multocida* Type A strains
Onderstepoort J. vet. Res. 47, 213-219 (1980)

19. Chladek, D.W., J.M. Williams and D.L. Gerber:
Canine parainfluenza-Bordetella bronchiseptica
vaccine: Immunogenicity
Am. J. vet. Res. 42, 268-270 (1981)
20. Choman, B.R.: Sequential growth of Clostridium
chauvoei, Clostridium septicum, and Clostridium
novyi in the same medium
Am. J. vet. Res. 30, 1, 133-137 (1969)
21. Chou, G.: Medium for toxin production by Clostridium
perfringens in continous culture
Appl. Microbiol. 21, 794-798 (1971)
22. Collier, J.R.: Pasteurellae in bovine respiratory disease
J. Am. Vet. Med. Ass. 152, 824-828 (1968)
23. Daerr, H.-C.: Feldversuche mit Porcovac^R, einer Vakzine
gegen Coli-Infektionen der Ferkel
Blaue Hefte 61, 26 (1980)
24. Deutsches Arzneibuch
amtliche Ausgabe, 7. Ausgabe 1968
Dt. Apotheker-Verlag Stuttgart
Govi-Verlag GmbH Frankfurt
25. Dickel, H.: Zur Bekämpfung der Salmonellose in
Kälbermastbeständen
Dtsch. tierärztl. Wschr. 83, 311-350 (1976)
26. Dräger, K. und O. Ackermann: Aktive Immunisierung
gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis und
Leptospirose mit Candur^RSH und Candur^RSHL
Blaue Hefte 3/4, 7 (1962)
27. Dziaba, K.A., B. Hertrampf and G. Mickwitz: Oral
immunization of germ-free piglets with
formolized Escherichia coli vaccine
Proceedings IPVS 161 (1980)
28. Eickmeier, H.: Therapie innerer Krankheiten der
Haustiere
Enke Verlag, Stuttgart (1980)
29. Éliás, B. and T. Szent-Iványi: Studies on swine atrophic
rhinitis I. Investigations into the epizootology,
diagnosis, and specific prevention of the disease
Zbl. Vet. Med. B, 28, 363-370 (1981)

30. Fey, H. und G. Stiffler-Rosenberg: Messung von Tetanus Antitoxin beim Pferd mit dem Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)
Schweizer Archiv für Tierheilkunde
119 (11), 437-446 (1977)
31. Frühwein, N. und V. Hochstein-Mintzel: Bestimmung von Tetanus-Antikörpern im menschlichen Serum mit dem ELISA-Test (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)
Ärztl. Lab. 26, 271-274 (1980)
32. Hammer, D.: Die Immunisierung trächtiger Rinder gegen Pneumokokken-Polysaccharide und die biologische Bedeutung der im Kolostrum ausgeschiedenen spezifischen Antikörper
Zbl. Vet. Med. 8, 405-450 (1961)
33. Hamdy, A.H. and A.L. Trapp: Immunization of cattle against shipping fever: Experimental exposure
Am. J. Vet. Res. 25, 1648 (1964)
34. Herrlich A.: Handbuch der Schutzimpfungen
Springer Verlag, Berlin (1965)
35. Hogarth-Scott, R.S.: Levamisole vaccine combinations
1. Heightened antibody response
Aust. Vet. J. 56, 285-291 (1980)
36. Illés, J.: Orale Schutzimpfung gegen Colienterotoxämie bei Schweinen
Zbl. Bakt. Hyg. I.Abt. Orig. A 232, 477-481 (1975)
37. Jaeger, O. und R. Barth: Tierexperimentelle Erfahrungen mit einem ^RPrevacun/Tetanus-Kombinationsimpfstoff
Blaue Hefte 48, 381-386 (1972)
38. Jaeger, O., O. Ackermann, R. Barth und H. Stegmann:
^RCandivac - eine neue Kombinationsvaccine zur Schutzimpfung des Hundes
Blaue Hefte 51, 570-579 (1973)
39. Kantor, E.J., R.J. Wegrzyn and R.A. Goodnow: Canine infectious tracheobronchitis: Effects of an intranasal live canine Parainfluenza-Bordetella bronchiseptica vaccine on viral shedding and clinical tracheobronchitis (kennel cough)
Am. J. Vet. Res. 42, 1694-1698 (1981)

40. Katitch, R., Z. Voukitchevitch, D. Radovitch and
M. Zdravkovitch: Possibilité d'utilisation d'un
vaccin mixte contre l'avortement paratyphique
et les maladies par anaérobies du Mouton
Recueil de Méd. Vét, 149, 75-80 (1973)
41. Kennedy, K.K., S.J. Norris, W.H. Beckenhauer and
R.G. White: Vaccination of cattle and sheep with
a combined Clostridium perfringens Types C and
D toxoid
Am. J. Vet. Res. 38, 2, 1515-1517 (1977)
42. Kielstein, P., M. Michael, W. Schöll und D. Urbaneck:
Immunprophylaxe in Anlagen der Schweineproduktion
Mh. Vet. Med. 33, 248-252 (1978)
43. Kinne-Safran, E., E.M. Kurschilgen, A. Marquardsen und
H. Raettig: Orale Immunisierung mit nichtvermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
9. Mitteilung: Tierversuche zur Schutzimpfung
gegen Infektionen durch Enteritis-erregende
Salmonellen
Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig. A 208, 37-57 (1968)
44. Klose, F. und G. Schallehn: Ein Beitrag zur aktiven
und passiven Schutzimpfung gegen Clostridium
novyi und Clostridium tetani
Z. Immun.-Forsch. 134, 350-356 (1967)
45. Klose, F. und G. Schallehn: Ein Beitrag zur aktiven
und passiven Schutzimpfung gegen Clostridium
novyi und Clostridium tetani
2. Mitteilung
Z. Immun.-Forsch. 138, 480-487 (1969)
46. Köhler, R. und W. Schöll: Ergebnisse beim Einsatz
von Coliporc "Dessau"
Mh. Vet. Med. 27, 50-52 (1972)
47. Larson, K.A., and K.R. Schell: Toxicity and antigenicity
of shipping fever vaccines in calves
J. Am. Vet. Med. Ass. 155, 1, 495-499 (1969)
48. Latham, W.C., D.L. Bent, and L. Levine: Tetanus toxin
production in the absence of protein
Appl. Microbiol. 10, 146-152 (1962)

49. Marcus, I.: Vakzinierungsversuche gegen Typhimurium-Salmonellose bei Brieftauben
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 77, 385-389 (1964)
50. Matsuoka, T., C. Gale, and R.M. Berkman: Calfhood immunization against an experimental Parainfluenza and Pasteurella Challenge
Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci. 30, 228-232 (1966)
51. Matsuoka, T., T.M. Folkerts, and C. Gale: Evaluation in calves of an inactivated bovine rhinotracheitis and Parainfluenza-3 Vaccine combined with Pasteurella bacterin
J. Am. Vet. Med. Ass. 160, 333 (1972)
52. Mayr, A., G. Wizigmann, H. Schels und P. Plank: Entwicklung und Erprobung eines Kombinationsimpfstoffes gegen die Parainfluenza-3-, Mucosal-Disease- und Pasteurella hämolytica-Infektion des Rindes
Zbl. Vet. Med. 16, 454-479 (1969)
53. Mayr, A.: Panoramawechsel und neue polyvalente Verfahren zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten
Tierärztl. Umschau 32, 10, 511-535 (1977)
54. Mayr, A. und B. Bibrack: Arzneimittelallergie beim Rind
Tierärztl. Wschr. 83, 439-446 (1970)
55. Mayr, A.: Entwicklung neuer Immunisierungs- und Paramunisierungsverfahren in der Tiermedizin
Blaue Hefte 69, 494-510 (1979)
56. Mayr, A., B. Mayr, P. Thein und G. Wizigmann: Funktionell-synergistische Kombinationsvaccinen, ein neuer Impfstofftyp
Zbl. Vet. Med. B 26, 222-238 (1979)
57. Mayr, A. und W. Köhler: Infektionskrankheiten und ihre Erreger
Band 19: Mischinfektionen
Gustav Fischer Verlag Jena, 1980
58. Michel, C., J. Terré, J.P. Soulebot, P. Desmettre, G. Chappuis, and C. Stellmann: Vaccinations associées du chien, comparaison entre vaccinations successives et vaccinations simultanées
Bull. de l'Académie Vétérinaire de France 44, 277-278 (1971)

59. Myers, L.L.: Characterization of *Escherichia coli* obtained from newborn calves with diarrhea
Inf. Immunity 11, 493-496 (1975)
60. Myers, L.L.: Vaccination of cows with an *Escherichia coli* bacterin for the prevention of naturally occurring diarrheal disease in their calves
Am. J. Vet. Res. 37, 831-834 (1976)
61. Nedjalkov, St., N. Stoilowa und B. Pejtschey: Zur Wechselwirkung der Antigene in Mischvakzinen gegen Anaerobierinfektionen der Schafe
Arch. f. exp. Vet. Med. 27, 185-190 (1973)
62. Nyerges, G., and J. Lutter: The influence of the method of preservation of erythrocytes on the correlation between tetanus-antitoxin values as measured by passive haemagglutination and by seroneutralization tests in mice
J. Biol. Stand. 8, 311-316 (1980)
63. Nürnberg, H.: Kombinationsimpfungen beim Schwein
Mh. Vet. Med. 26, 927-931 (1971)
64. Peacock, G.V.: Comments of application of multiple-component vaccines
J. Am. Vet. Med. Ass. 163, 839 (1973)
65. Piendl, D.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirksamkeit einer kombinierten Gasbrand-Tetanus-Impfung bei der Maus
Inaug. Diss. Vet. Med. München (1980)
66. Porter, P., R. Kenworthy, D.W. Holme, and S. Horsfield: *Escherichia coli* antigens as dietary additives for oral immunization of pigs: Trials with pig creep feeds
Vet. Rec. 92, 630-636 (1973)
67. Porter, P., R. Kenworthy, and I. Thompson: Oral immunization and its significance in the preruminant calf
Vet. Rec. 97, 24-28 (1975)
68. Porter, P., A.J. Blades, W.D. Allen, and J.W. Chidlow: Live vs. dead *E.coli* vaccines: Effects on immunity, health and production
Proceedings IPVS, 163 (1980)

69. Raettig, H.: Provokation einer Infektion durch Schutzimpfung. XII Mitteilung: Beispiel für provozierte Epidemien (Provokationsepidemien) aus der allgemeinen Epidemiologie
Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig. A 203, 326-365 (1967)
70. Raettig, H.: Orale Immunisierung gegen Salmonellen bei der Kälbermast
Fortschr. Vet. Med. 28, 120-122 (1978)
71. Safarov, Y.: (Simultaneous immunization of animals against salmonellosis and clostridial infections Effects of varying the proportions of antigens)
Doklady Vsesoyvznoi Akademii Sel'skokhoz. Nauk No. 10, 34-37 (1971)
Vet. Bull. 42, 5139 (1972)
72. Sampson, G.R., T. Matsuoka, R.D. Olson, J.A. Miyat, and L.V. Tonkinson: Clinical appraisal of an inactivated bovine rhinotracheitis/parainfluenza-3-vaccine with pasteurilla bacterin
Vet. Med. Small An. Clin. 67, 899-902/1354-1356 (1972)
73. Sampson, G.R., C. Gale, N.G. Elliston, H.P. Grueter, J.W. McAskill, and L.V. Tonkinson: Clinical studies of a modified live virus Bovine rhinotracheitis/Parainfluenza-3 vaccine with pasteurilla bacterin as the diluent
Vet. Med. Small An. Clin. 67, 899-902 (1972)
74. Santa Rosa, C.A., M.M. Galton, and C.R. Sulzer: Evaluation of a polyvalent leptospiral vaccine in guinea pigs
Am. J. Vet. Res. 26, 979-983 (1965)
75. Schiefer, B., and H. Stünzi: Pulmonary lesions in guinea pigs and rats after subcutaneous injection of complete Freund's adjuvant or homologous pulmonary tissue
Zbl. Vet. Med. A, 26(1) 1-10 (1979)

76. Schimmel, D., F. Schulze, W. Bathke, M. Kittlich,
H. Koch, K. Linde, K. Lutter und S. Schmid:
Zur Immunprophylaxe der Coliinfektionen bei
Schweinen mit Lebendimpfstoff 1. Mitteilung:
Anwendung bei Coliinfektionen der ersten Lebenstage
Arch. exp. Vet. Med. 29, 335-348 (1975)
77. Schimmel, D., F. Schulze, U. Anders, H. Bockmann, F.
Gottschalk, K. Lutter und K.-H. Streibhardt:
Zur Immunprophylaxe der Koli-enterotoxämie der
Schweine mit einem Sm-d-Lebendimpfstoff
Mh. Vet. Med. 33, 253 (1978)
78. Schöll, W., M. Michael und I. Koban: Erste Erfahrungen
zur Bekämpfung von Streptokokken-Bestandsinfektionen
bei Ferkeln unter Einsatz stallspezifischer
Impfstoffe
Mh. Vet. Med. 30, 890-893 (1975)
79. Schöss, P.: Atrophic rhinitis: Field test of a
Bordetella-Pasteurella vaccine
Proceedings IPVS, 204 (1980)
80. Schuller, W., H. Trubrick, O. Kosztolich, J. Flatscher,
and J. Jahn: Vaccination against atrophic rhinitis
in swine with a combined Bordetella bronchiseptica
Pasteurella multocida Vaccine
Zbl. Vet. Med. B 27, 125-130 (1980)
81. Sinha, A.K., and L.B.M. Prasad: An experimental
study with combined vaccines against haemorrhagic
septicaemia and blackquarter
Brit. vet. J. 129, 175-183 (1965)
82. Söderlind, O., and R. Möllby: Virulence factors of
Escherichia coli strains isolated from field
material of piglets with diarrhea from vaccinated
and un-vaccinated sows
Proceedings IPVS, 145 (1980)
83. Sterne, M., I. Batty, and A. Thomson: Immunization of
sheep with multiplecomponent Clostridial
vaccines
Vet. Rec. 74, 909-913 (1962)

84. Stiffler-Rosenberg, G. und H. Fey: Messung von Tetanus-Antitoxin mit dem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Schweiz. med. Wschr. 107, 1101-1104 (1977)
85. Storm, P.K., J.C. Baars und A. Remings: Impfversuche gegen Escherichia coli Enterotoxikose bei Absatzferkeln
Fortschr. Vet. Med. 30, 212-215 (1980)
86. Thomson, R.T., I. Batty, A. Thomson, J.B. Kerry, H.B.G. Epps, and W.H. Foster: The immunogenicity of a multicomponent clostridial oil emulsion vaccine in sheep
Vet. Rec. 85, 81-84 (1969)
87. Truscynski, M., and D. Ciosek: Immunization of swine against Escherichia coli infection
Proceedings IPVS, 115 (1980)
88. Udovičić, I.: Comparative study of immune response in rabbits to the use of some clostridial toxoids and their mixture
Veterinarski Arhiv 49, 239-250 (1979)
Zit. Vet. Bull. (1980), 50, 771C
89. Ungureanu, C., V. Minciuna, A. Jordache und U. Fierlinger: Immunprophylaktische Methoden zur Vorbeugung der Pneumopathien bei Jungrindern.
Arch. exp. Vet. Med. 35, 437-441 (1981)
90. Urbanec, D.: Stand und Entwicklung von Impfstoffen für die Rinderproduktion
Mh. Vet. Med. 36, 19-26 (1981)
91. Wittig, W.: Erprobung der Muttertiervakzination gegen die Koliruhr der Saugferkel
Mh. Vet. Med. 27, 494-499 (1972)
92. Wittowski, G., M. Horner und H. Tenhumberg: Vakzinierung gegen Rhinitis atrophicans mit Rhinovac^R
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 214-218 (1980)

Herrn Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr bin
ich für die Überlassung des Themas und
die Unterstützung während der Untersuchungen
zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil. G. Baljer möchte
ich herzlich danken für die umsichtige
Leitung der Untersuchungen und die
selbstlose Hilfe bei der Anfertigung dieser
Dissertation, ebenso den Mitarbeitern
in seinem Labor für ihre Kameradschaft.

Lebenslauf

von Luise Franziska A N D R A E

Geboren: Am 28. 03. 1954 in Mühldorf/Obb.
Eltern: Heinrich Andrae, Oberstudiendirektor i.R.
Edeltraud Andrae, geb. Perr
Schulbesuch: 1960-1961 Volksschule Mühldorf
1961-1964 Volksschule Landshut - Berg
1964-1973 Hans-Leinberger-Gymnasium
in Landshut
1973 Abitur in Landshut
Studiengang: Zum WS 1973/74 Beginn des Studiums der
Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München
1974/75 ein Jahr Unterbrechung wegen Unfall-
verletzungen
Januar 1980 Staatsexamen

